

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série U, N° 86. Paris 1944

RECHERCHES SUR LE DOSAGE
DE
L'ACIDE β -HYDROXYBUTYRIQUE

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le

1944

PAR

Daniel COUSIN

Pharmacien
de la Faculté de Paris

JURY { MM. FLEURY, *Président.*
FABRE, *Professeur.*
GUILLOT, *Maître de Conférences.*

PARIS

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1944

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série U, N° 86. Paris 1944

RECHERCHES SUR LE DOSAGE
DE
L'ACIDE β -HYDROXYBUTYRIQUE

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le

1944

PAR

Daniel COUSIN

Pharmacien
de la Faculté de Paris

JURY

MM. FLEURY, *Président.*

FABRE, *Professeur.*

GUILLOT, *Maître de Conférences.*

PARIS

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1944

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. DAMIENS, *Doyen*, O. ✱, **OL**.
M. SOMMELET, *Assesseur*, ✱, **OL**.
H. J. LIONNET, *Secrétaire*, **OL**.

PROFESSEURS

MM. DAMIENS, O. ✱, OL	Chimie minérale.
SOMMELET, ✱, OL	Chimie organique.
FABRE, ✱, OL	Toxicologie.
DELABY, ✱, OL	Pharmacie chimique.
PICON, ✱, OL	Physique.
MASCRÉ, ✱, OL	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.
BACH, ✱, OL	Botanique générale.
FLEURY, OL	Chimie biologique.
RÉGNIER, OL	Microbiologie.
JANOT, OA	Pharmacie galénique.
CHARONNAT, OL	Chimie analytique.
VALETTE, OA	Zoologie appliquée.

Doyens honoraires : MM. RADAIS, O. ✱, **OL**. — GUÉRIN, O. ✱, **OL**.

Professeurs honoraires :

MM. DELÉPINE, O. ✱, **OL** et LEBEAU, O. ✱, **OL**, Membres de l'Institut.
PERROT, C. ✱, **OL**, COUTIÈRE, O. ✱, **OL**, BOUGAULT, O. ✱, **OL**,
LUTZ, ✱, **OL**, GORIS, O. ✱, **OL**, HÉRISSEY, O. ✱, **OL**,
LAUNOY, O. ✱, **OL**.

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM. BEDEL, ✱, OL	Minéralogie, Législation et Déontologie pharmaceutiques.
N.....	Hydrologie et Hygiène.
N.....	Cryptogamie et Technique microbiologique. Pharmacodynamie.
N...	Histoire naturelle.
GUILLOT.	Sciences physiques et chimiques.
PARIS.	Sciences naturelles.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DOMANGE, OA , trav. pratiques de 1 ^{re} année.	Chimie générale et pharmaceutique.
GAUTIER, OA , trav. pratiqu. de 2 ^e et 3 ^e année.	Chimie analytique.
CRÉTÉ	Micrographie.
CORRIEZ, OA	Physique.
DAVID, OL	Microbiologie.
COURTOIS.	Chimie biologique, Bromatologie et Pharmacie chimique.

Bibliothécaire en Chef : M. GARNIER, **OA**.

Bibliothécaire : M^{lle} LAVAUD, **OA**.



A LA PIEUSE ET VÉNÉRÉE MÉMOIRE DE MA MÈRE

*Enlevée si prématurément à mon amour
filial.*

A MON PÈRE

*Auxquels je dois tant, humble témoignage
de ma profonde affection et faible gage de
ma reconnaissance, je dédie ce travail.*

A MA DOUCE ET CHÈRE COMPAGNE

Dont la compréhension et les encouragements m'ont grandement facilité l'accomplissement de ce travail. Faible témoignage de mon immense tendresse.

A MES FILS

Avec tout l'espoir que je mets en eux.

A MES BEAUX-PARENTS

Que j'aime profondément.

A MON BEAU-FRÈRE ET MA BELLE-SŒUR

En fraternelle affection.

A MA FAMILLE

A MES AMIS

A MES MAÎTRES

MONSIEUR LE PROFESSEUR HENRI HÉRISSEY

Membre de l'Académie de Médecine
Professeur honoraire à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien honoraire des Hôpitaux de Paris
Officier de la Légion d'honneur

*Hommage de notre très vive gratitude et
de la grande vénération que nous lui avons
toujours portée.*

MONSIEUR LE PROFESSEUR PAUL FLEURY

Professeur à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien-chef des Hôpitaux psychiatriques de la Seine

*Qui nous a donné le sujet de cette thèse
et nous a constamment guidé dans notre
travail. Hommage de notre profonde gra-
titude et de notre respectueux attachement.*

A JEAN COURTOIS

Chef des Travaux pratiques de 4^e année à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien des Hôpitaux de Paris

*L'excellent camarade d'Internat, l'ami de
toujours, qui fut pour nous un conseiller
de tout premier ordre, en affectueuse amitié.*

A PIERRE BROTHIER

Docteur en Pharmacie

*Pharmacien-Capitaine de réserve sous les
ordres de qui nous eûmes l'honneur de
servir durant la campagne 1939-1940, qui a
beaucoup contribué à nous faire entre-
prendre ce travail et nous a facilité sa réa-
lisation. En témoignage de notre grand
attachement et de notre vive affection.*

RECHERCHES SUR LE DOSAGE DE L'ACIDE β -HYDROXYBUTYRIQUE

INTRODUCTION

L'acide β -hydroxybutyrique constitue avec l'acétone et l'acide acétylacétique un ensemble improprement désigné sous le nom de « corps cétoniques ». Ces corps se rencontrent dans l'urine de sujets soumis à un régime privé de glucides et dans certaines formes du diabète ⁽¹⁾. On admet en général que la β -oxydation des acides gras biologiques à nombre pair d'atomes de carbone conduit à l'acide butyrique. Ce dernier serait transformé en acide β -hydroxybutyrique ; la combustion de cet acide en eau et anhydride carbonique nécessite la présence de glucose ou de ses produits de transformation.

Lorsque ce processus est altéré, les lipides, incomplètement brûlés, conduisent aux corps cétoniques éliminés par l'urine.

La recherche et le dosage de ces corps cétoniques dans l'urine et même dans le sang ont suscité de nombreux travaux. On peut considérer qu'actuellement le problème du dosage de l'acétone est résolu ; il existe un certain nombre de techniques de recherches très sensibles [FLOUQUET (26)]. De même des macro- et microméthodes précises en permettent le dosage [AWAD (2)]. [P. FLEURY et CARBOU (23)].

Il n'en est pas de même pour l'acide β -hydroxybutyrique ; il n'existe pas de technique spécifique de recherche et son dosage ne peut encore être effectué par une technique simple et à l'abri de toute critique.

C'est en 1883 que STADELMANN (54) signala qu'au cours du coma diabétique l'urine renfermait un acide fournissant par distillation

(¹) Un produit de polymérisation de l'acide β -hydroxybutyrique a été mis en évidence par LEMOIGNE et ROUKHELMAN [42] chez les microbes. D'après ces auteurs, il constituerait jusqu'à 26 % de la matière sèche de certains bacilles voisins du *B. megatherium*.

en présence d'acide sulfurique de l'acide crotonique $\text{CH}^3 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CO}^2\text{H}$.

L'année suivante, KÜLZ [36] et MINKOWSKI [47], travaillant indépendamment, identifièrent à l'acide β -hydroxybutyrique le corps inconnu.

Par la suite, MAGNUS-LÉVY [43] réussit à séparer cet acide sous forme de l'isomère lévogyre. Il montra que les quantités d'acide présentes dans l'organisme au cours du coma sont suffisantes pour entraîner une intoxication acide fatale. La détermination de la réserve alcaline du plasma a confirmé ces conclusions.

Dans l'urine, l'acide β -hydroxybutyrique est généralement associé à environ un tiers d'acide acétylacétique $\text{CH}^3 - \text{CO} - \text{CH}^2 - \text{CO}^2\text{H}$ qui en dérive par oxydation. Cet acide β -cétonique est aisément décarboxylé en acétone.

Les premières techniques de dosage de l'acide β -hydroxybutyrique dans l'urine furent basées sur l'isolement par extraction étherée, suivi d'un examen polarimétrique BLACK [6], HARTLEY [31].

Ces techniques ont l'inconvénient d'être longues ; elles sont difficilement applicables à des examens cliniques ; en outre, elles fournissent des résultats entachés d'une erreur par défaut : extraction incomplète, racémisation et destruction au cours de l'isolement.

Aussi, depuis une trentaine d'années, les biochimistes préfèrent-ils transformer l'acide β -hydroxybutyrique en acétone par oxydation chromique.

SCHAFER [53], en 1908, montra que le mélange sulfochromique oxyde l'acide β -hydroxybutyrique en acétone qu'il sépara par distillation et titra par iodométrie.

Cette réaction n'est pas complète et c'est pourquoi diverses modifications furent proposées à la technique originale de SCHAFER ; elles portent soit sur les modalités de l'oxydation chromique, soit sur le mode de dosage de l'acétone.

BARNES et WICK [3] la dosent par iodométrie comme SCHAFER ; MARIOTT [45], FOLIN et DENIS [27] par pesée de sa combinaison avec le cyanure de mercure ; VAN SLYKE [56] en la captant au fur et à mesure de sa formation et la précipitant combinée au sulfate mercurique, réaction de précipitation découverte par DENIGÉS [16].

JOWETT et QUASTEL [35] dosent par iodométrie l'acétone libérée du précipité avec le sulfate mercurique.

GRANDALL [13] a proposé récemment de sensibiliser la technique de VAN SLYKE en dosant le mercure du complexe par une technique colorimétrique originale : décoloration par le sel mercurique du sulfo-cyanure ferrique.

BEHRE et BENEDICT [4], LAUERSEN [38], EICHLER et HINDEMITH [17] dosent l'acétone par appréciation de la coloration qui se développe avec l'aldéhyde salicylique en milieu alcalin selon la réaction établie par FROMMER [29].

Ces deux méthodes ne sont pas sujettes à critique quant au macro ou microdosage de l'acétone, mais le deviennent quand il s'agit du rendement de l'oxydation en acétone.

VAN SLYKE a fait une étude détaillée de cette réaction : elle est toujours incomplète quelles que soient les conditions opératoires : durée, température, concentration en acide.

D'ailleurs, ces conditions opératoires influencent fortement le rendement des oxydations sulfochromiques [CORDEBARD (11)].

VAN SLYKE a constaté qu'une partie de l'acide β -hydroxybutyrique était décomposée en acide acétique qu'il put isoler à l'état de sel d'argent ; il se forme en outre un peu d'acide formique. Les conditions les plus favorables sont réalisées en captant l'acétone par le sulfate mercurique au fur et à mesure de sa formation. En opérant dans les meilleures conditions, VAN SLYKE ne put réussir à fixer qu'environ 75 p. 100 de l'acétone qui devrait théoriquement prendre naissance. HUBBARD [33] prétend néanmoins pouvoir fixer 83 p. 100 par ce procédé.

Notre travail était presque terminé lorsque nous avons eu connaissance d'un récent mémoire de EICHLER et HINDEMITH [17]. Ces auteurs, étudiant à nouveau l'oxydation en acétone de l'acide β -hydroxybutyrique, montrèrent que le sulfate cérique est un oxydant trop faible ; par contre, le permanganate de potassium, trop énergique, oxyde l'acétone formée (1).

A la suite de divers essais sur l'oxydation sulfochromique, EICHLER et HINDEMITH constatèrent que l'emploi de solution de bichromate de potassium et sulfate acide de sodium fournit à 100° les meilleurs résultats. Dans les conditions opératoires de ces auteurs, le rendement

(1) Cependant ENGFELDT [18] puis LEITESS et ODINOW [41] ont préconisé des techniques basées sur l'oxydation permanganique de l'acide β -hydroxybutyrique en acétone et dosage de l'acétone formée.

en acétone croît de 78 p. 100 avec 174 γ d'acide β -hydroxybutyrique à 90 p. 100 avec 19,4 γ d'acide. Il serait même meilleur avec de plus faibles doses d'acide.

Nous nous sommes proposés d'étudier le dosage de l'acide β -hydroxybutyrique. Un des plus intéressants perfectionnements à la chromométrie apportés au cours de ces dernières années a été l'emploi par CORDEBARD [11] de solutions nitrochromiques. Ces solutions oxydent rapidement et régulièrement certains corps comme l'éthanol. Nous avons étudié l'action de solutions nitrochromiques sur l'acide β -hydroxybutyrique. Nous avons constaté qu'il était très rapidement attaqué, même à la température du laboratoire. L'oxydation dépasse le stade acétone et il se fixe cinq atomes d'oxygène par molécule d'acide β -hydroxybutyrique. Nous avons ainsi pu mettre au point une technique de dosage de cet acide en déterminant la quantité d'oxydant qui se trouve réduite.

Cette méthode nous a fourni d'excellents résultats sur des solutions pures d'acide β -hydroxybutyrique, résultats beaucoup plus précis que l'oxydation sulfochromique. Notre technique est par contre moins spécifique : l'oxydation sulfochromique donne, comme produit principal, de l'acétone, tandis que l'acétone se trouve oxydée dans l'oxydation nitrochromique. Nous n'avons donc pas cherché à appliquer notre technique à l'urine.

Nous avons alors étudié l'action sur l'acide β -hydroxybutyrique d'un oxydant à action assez étroite : l'acide periodique [FLEURY et LANGE (24)]. Un certain nombre d'essais nous ont montré que l'acide periodique n'attaquait l'acide β -hydroxybutyrique qu'à 100°, et encore, cette attaque, très lente, est incomplète et irrégulière.

C'est pourquoi nous avons étudié l'action d'un autre oxydant. R. GROS [30] a montré que l'iodomercurate alcalin (réactif de NESSLER) oxyde certains alcools secondaires en les cétones correspondantes, en particulier l'alcool isopropylique est oxydé en acétone. L'acétone donne avec le réactif de NESSLER un précipité de complexe mercuriel permettant le dosage de l'acétone [GROS (30)], [P. FLEURY et AWAD (21)]. Cette réaction très sensible permet d'ailleurs le microdosage de l'acétone [P. FLEURY et CARBOU (23)]. L'acide β -hydroxybutyrique, réagissant en tant qu'alcool secondaire, devrait donner l'acide cétonique correspondant : l'acide acétylacétique, corps instable qui est aisément transformé en acétone.

P. FLEURY et AWAD [21] ont effectivement observé que cet acide acétylacétique donne avec le réactif de NESSLER un précipité de la combinaison mercurielle de l'acétone. Quelques essais préliminaires leur ont permis de constater qu'en chauffant l'acide β -hydroxybutyrique avec le réactif de NESSLER, il se forme progressivement un précipité ayant l'apparence de celui donné par l'acétone.

Sur les conseils de Monsieur le Professeur P. FLEURY, nous avons repris l'étude de cette réaction et constaté que le réactif de NESSLER oxyde l'acide β -hydroxybutyrique en acétone et que cette dernière est alors précipitée à l'état de combinaison mercurielle.

Le réactif de NESSLER agit donc successivement comme agent d'oxydation puis comme réactif précipitant. En dosant par iodométrie l'acétone libérée de la combinaison mercurielle, nous avons pu doser l'acide β -hydroxybutyrique. Nous avons ainsi mis au point une nouvelle technique originale de dosage de cet acide en solutions pures. L'extension à l'urine s'est révélée assez délicate. Nous proposons cependant une nouvelle technique de dosage de l'acide β -hydroxybutyrique dans l'urine, qui est un peu plus spécifique que celle classique de VAN SLYKE et en tout cas fournit des résultats de même ordre.

Avant de commencer l'exposé détaillé de nos recherches, nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à Monsieur le Professeur HÉRISSEY pour le grand intérêt qu'il nous a toujours porté.

Elève du Lycée d'Evreux où notre Maître fit lui-même ses études secondaires, nous eûmes souvent l'occasion, dans notre prime jeunesse, d'entendre exalter la noble Figure de celui qui a tant fait et fait tant encore pour notre profession. Il fut toujours un conseiller éclairé et compréhensif dont nous venions solliciter l'avis dans les circonstances difficiles. Après nous avoir confié une place d'interne provisoire dans son service de l'Hôpital Saint-Antoine, il nous a, plusieurs années après, encouragé à poursuivre des recherches en vue de l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie. Accueilli dans son laboratoire, il n'a cessé de nous encourager au cours de nos travaux. Que notre Maître veuille trouver ici un faible témoignage de notre très respectueuse gratitude et de la très profonde vénération que nous lui portons.

Notre Président de thèse, Monsieur le Professeur FLEURY, nous a fourni le sujet de ce travail ; il nous a guidé au long de nos recherches

et nous avons utilisé avec fruit ses précieux conseils. Sa grande expérience de la chimie analytique nous a été d'une utilité primordiale, et nous sommes heureux d'exprimer à ce Maître bienveillant notre profonde reconnaissance et notre indéfectible attachement.

Nous remercions Monsieur le Professeur FABRE et Monsieur GUILLOT Maître de Conférences, d'avoir bien voulu nous faire l'honneur de faire partie de notre Jury de thèse.

Notre ancien camarade d'Internat, notre ami JEAN COURTOIS, a accepté de nous initier à la pratique souvent ingrate du laboratoire et a constamment dirigé nos recherches n'épargnant ni son temps ni sa peine. Nous profitons de cette occasion pour lui dire que nous apprécions à sa juste valeur tout le dévouement dont il a fait preuve à notre égard et l'assurons à nouveau de notre affectueuse amitié.

Avec sa bienveillance coutumière, Monsieur CATTELAÏN, Assistant de Monsieur le Professeur FLEURY, a mis tout en œuvre pour nous initier aux difficultés de la bibliographie et nous procurer, malgré les difficultés du moment, nombre de produits chimiques indispensables à l'élaboration de ce travail. Nous lui exprimons notre très vive gratitude ainsi d'ailleurs qu'à Monsieur POIROT pour tout l'intérêt qu'il a porté à nos recherches.

Nous devons à Monsieur CHABRIER DE LA SAULNIÈRE la réalisation de l'appareil à hydrogénation : nous remercions très amicalement ce distingué chimiste de nous avoir fait profiter de sa grande compétence pour le montage de nos appareils.

Le Conseil de la Faculté a bien voulu nous accorder une subvention au cours de notre travail. Qu'il veuille trouver ici l'expression de toute notre gratitude.

PLAN DU TRAVAIL

A. — ACTION DE DIFFÉRENTS RÉACTIFS OXYDANTS SUR DES SOLUTIONS PURES D'ACIDE β -HYDROXYBUTYRIQUE.

- 1^o *Préparation des corps utilisés.*
- 2^o *Action des solutions nitrochromiques sur l'acide β -hydroxybutyrique.*
- 3^o *Action de l'acide periodique sur l'acide β -hydroxybutyrique.*
- 4^o *Action de l'iodomercurate alcalin sur l'acide β -hydroxybutyrique.*

B. — RECHERCHES EN VUE D'APPLIQUER A L'URINE LE DOSAGE DE L'ACIDE β -HYDROXYBUTYRIQUE PAR LE RÉACTIF DE NESSLER.

- 1^o *Dosage de l'acide β -hydroxybutyrique en solutions pures additionnées de substances pouvant se rencontrer dans l'urine.*
- 2^o *Action du réactif de Nessler sur des urines additionnées d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique.*

C. — CONCLUSIONS.

D. — BIBLIOGRAPHIE.

E. — TABLE DES MATIÈRES.

PREMIÈRE PARTIE

ACTION DE DIFFÉRENTS RÉACTIFS
OXYDANTS SUR DES SOLUTIONS PURES
D'ACIDE β -HYDROXYBUTYRIQUE

PRÉPARATION DES CORPS UTILISÉS

A) PRÉPARATION DU β -HYDROXYBUTYRATE D'ÉTHYLE

$$\begin{array}{ccccccc} \text{CH}^3 & - & \text{CO} & - & \text{CH}^2 & - & \text{CO}^2 \\ & & & & & & | \\ & & & & & & \text{C}^2\text{H}_5 + \text{H}^2 = \text{CH}^3 - \text{CHOH} - \\ & & & & & & | \\ & & & & & & \text{CH}^2 - \text{CO}^2 - \text{C}^2\text{H}_5. \end{array}$$

(¹) Nous remercions très respectueusement M. le Professeur DELÉPINE et son Assistant M. HOREAU de la bienveillance avec laquelle ils nous ont accueilli dans leur laboratoire du Collège de France pour nous permettre de réaliser notre première hydrogénation.

(²) Préparé en 1927 par le chimiste américain RANEY [50], vulgarisé par COVERT et ADKINS [12] et introduit en France en 1935 par M. DELÉPINE et A. HOREAU [14].

On filtre alors de façon à séparer le nickel RANEY et la liqueur alcoolique, soumise à la distillation, fournit d'emblée et sans aucune difficulté du β -hydroxybutyrate d'éthyle.

Préparation du nickel de Raney. — Nous avons suivi la technique indiquée par J. BOUGAULT, E. CATTELAÏN et P. CHABRIER [8]. Nous avons utilisé, dans tous nos essais, un nickel préparé extemporanément à partir de l'alliage nickel-aluminium à 35 p. 100 de nickel.

La technique suivante fournit un nickel pulvérulent très actif, exempt d'aluminate de sodium.

Dans un Bécher en verre Pyrex de 500 cm³ on introduit 200 cm³ de lessive de soude à 36° Bé, puis, par petites portions, 30 grs d'alliage pulvérisé et passé au tamis d'acier étamé n° 90, en ayant soin d'attendre, avant de faire une nouvelle addition, que les mousses abondantes qui se forment soient retombées. Il est bon de refroidir, surtout au début, afin de modérer l'attaque. L'opération, qui dure environ 30 minutes, doit avoir lieu sous une hotte bien ventilée pour éviter les projections de petites vésicules alcalines entraînées par le dégagement tumultueux d'hydrogène.

Quand la lessive de soude ne réagit plus à froid, on ajoute 100 cm³ environ d'eau distillée pour faciliter la décantation.

Celle-ci étant effectuée, on ajoute une nouvelle quantité (50 cm³) de lessive de soude et l'on chauffe au bain-marie bouillant quelques minutes pour parfaire l'attaque de l'alliage. On procède ensuite au lavage, par décantation, du nickel pulvérulent qui s'est rassemblé au fond du récipient et l'on poursuit ces lavages jusqu'à disparition presque totale de la réaction alcaline.

Le nickel humide est versé dans un flacon de 50 cm³ et additionné d'eau afin d'obtenir un volume total de 50 cm³. La suspension ainsi obtenue renferme environ 10 grs de produit actif.

Cette suspension aqueuse malgré le soin apporté au lavage est toujours légèrement alcaline ⁽¹⁾ et doit être neutralisée, s'il y a lieu, au moment de l'emploi.

(1) A propos du lavage il est indiqué : « jusqu'à disparition presque totale de la réaction alcaline » et un peu plus loin il est dit : « Cette suspension aqueuse, malgré le soin apporté au lavage, est toujours légèrement alcaline » ; cette contradiction s'explique de la façon suivante : Au cours du lavage, pour s'assurer que la réaction n'est plus alcaline on ajoute de

Le nickel ainsi obtenu est très actif ; séché, il est très oxydable et très pyrophorique. Il renferme encore de l'alumine, mais cette dernière, contrairement à l'opinion de CHAUSSIN [10] et d'HILLY [32] ne semble pas diminuer l'activité du catalyseur. Il contient, en outre, de notables proportions d'aluminium et de fer, ainsi que des traces de cobalt et de soufre.

Appareil à hydrogénation. — DESCRIPTION : L'hydrogénation s'effectue dans un ballon Pyrex de 500 cm³ à deux tubulures latérales, l'une reliée à la trompe à vide pour chasser l'air contenu dans l'appareil, l'autre au tube d'adduction de l'hydrogène (Fig. 1).

Le dit ballon, renfermant le corps à hydrogéner et le catalyseur, est monté sur un agitateur mécanique relié à un moteur électrique qui réalise un brassage régulier et réglable à volonté.

Pour obtenir une pression toujours égale et relativement faible, l'hydrogène, à sa sortie du manodétendeur, se rend dans un système de deux vases communiquants dont l'un est surélevé par rapport à l'autre. Ces deux vases renferment de l'eau colorée par du bichromate pour faciliter la lecture des volumes. L'hydrogène refoule le liquide coloré dans le flacon supérieur, et c'est la pression de cette colonne de liquide que nous utilisons pour effectuer notre hydrogénation.

Cet hydrogène, avant de se rendre au flacon renfermant le corps à hydrogéner, passe, grâce à un jeu de robinets à trois voies, soit dans un flacon gradué de 1.200 cm³ si l'hydrogénation est rapide, soit dans une burette de 50 cm³ dans le cas d'une hydrogénation lente. La vitesse d'hydrogénation se mesure par la montée, dans l'un ou l'autre récipient, du liquide coloré que notre gaz a chassé dans un flacon surélevé.

FONCTIONNEMENT : 1° Introduire le corps à hydrogéner et le catalyseur dans le ballon Pyrex ; assujettir ce dernier sur l'agitateur mécanique et relier chaque tubulure au tube correspondant ;

L'eau dans laquelle on vient de mettre en suspension le nickel et, aussitôt après le dépôt de celle-ci (10 à 20 secondes), un peu de phtaléine : celle-ci ne doit plus se colorer en rouge. Ceci est le terme du lavage.

L'expérience montre que si on laisse cette eau de lavage ainsi neutre, en contact avec le nickel, elle s'alcalinise lentement : c'est pourquoi il est indiqué que la suspension aqueuse est toujours légèrement alcaline.

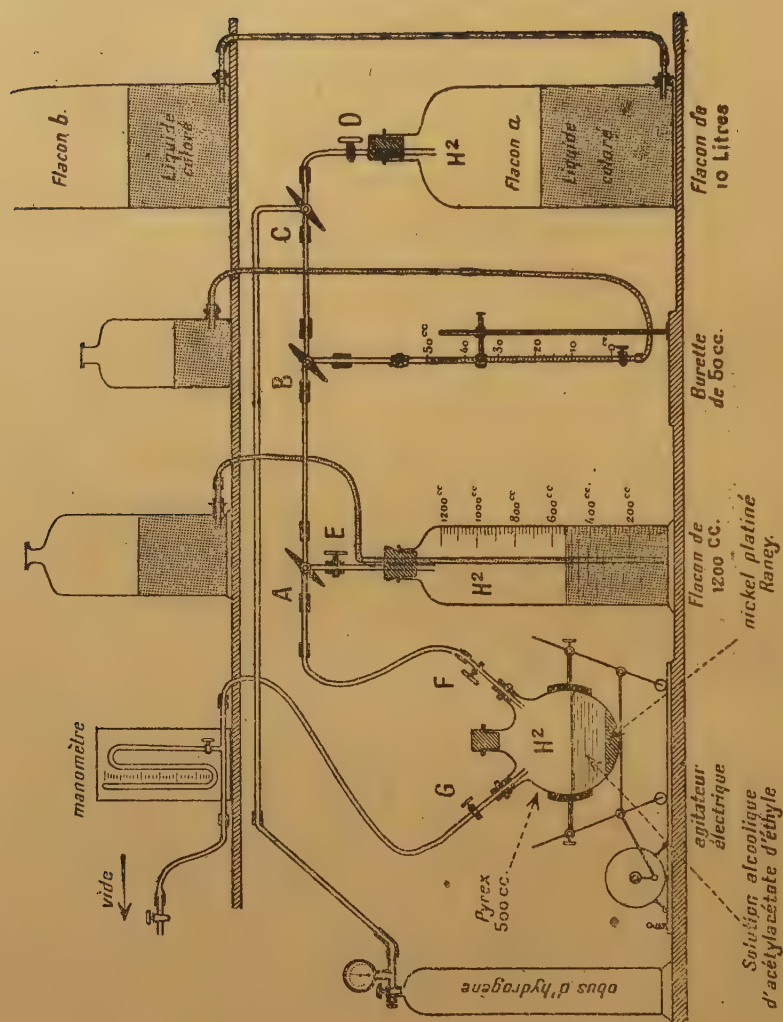


FIGURE No I.
Appareil à hydrogénation.

2° Faire le vide dans l'appareil : ouvrir *G* et *F*. Mettre *A*, *B* et *C* en position 1-2-3. Ouvrir *E* et *D*. Au bout de quelques minutes fermer *G* ;

3° Remplir d'hydrogène : ouvrir les robinets à pointe du manodétendeur. Mettre *C* en position 2-3 : l'hydrogène fait passer le liquide coloré du flacon *a* dans le flacon *b* ;

4° Emplir de gaz le flacon gradué de 1.200 cm³ : mettre *A* en 2-3, *B* et *C* en 1-3 ;

5° Mettre l'agitateur mécanique en marche ;

6° Mettre *A* en position 1-2 et noter l'heure. L'hydrogène passe lentement dans le ballon Pyrex et on lit à chaque minute le niveau où se trouve le liquide coloré ;

Quand notre flacon gradué est plein de liquide, on le remplit à nouveau d'hydrogène (*A* en position 2-3) et on continue comme précédemment ;

7° Quand la vitesse d'absorption de l'hydrogène s'est considérablement ralentie et que la montée du liquide dans le flacon gradué est devenue presque imperceptible, mettre *A* en 1-3 et *B* en 2-3 pour remplir la burette, puis en 1-2 jusqu'à cessation de l'absorption.

E et *D* constituent des robinets de sécurité que l'on peut fermer avant de se servir de *A* ou *B* si l'on est peu entraîné à se servir des robinets à trois voies.

Bien entendu, si la quantité d'hydrogène contenue dans le flacon *a* est insuffisante, il suffira de faire le remplissage à nouveau.

Hydrogénation de l'acétylacétate d'éthyle. — Le poids moléculaire de ce corps étant de 130, on doit fixer en théorie 9 litres 60 d'hydrogène pour transformer 52 grs d'acétylacétate d'éthyle en β -hydroxybutyrate d'éthyle.

Dans notre ballon à double tubulure nous mettons successivement :

52 grs d'acétylacétate d'éthyle commercial, purifié par redistillation,
250 cm³ d'alcool à 95°,

4,5 grs de catalyseur (nickel *BANEY*),

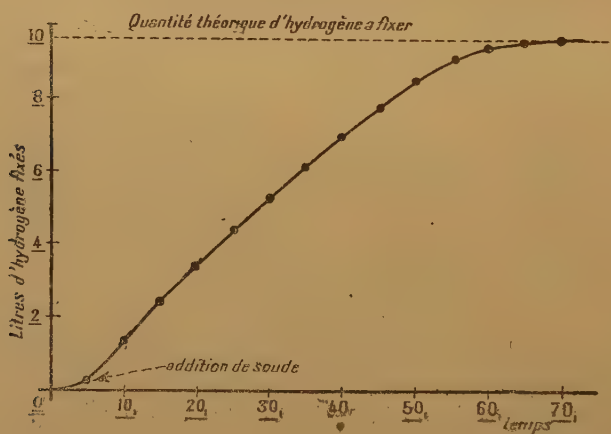
0,1 gr. de platine.

Le graphique et la courbe ci-après (Graphique I et Courbe I) permettent de se rendre compte de la fixation d'hydrogène en fonction du temps. L'addition de soude fait démarrer la réaction qui se pour-



GRAPHIQUE N° I.

Obtention du β -hydroxybutyrate d'éthyle par hydrogénation catalytique de l'acétylacétate d'éthyle, en fonction du temps et de l'alcalinité.



COURBE N° I.

Obtention du β -hydroxybutyrate d'éthyle par hydrogénation catalytique de l'acétylacétate d'éthyle, en fonction du temps et de l'alcalinité.

Dans le graphique et la courbe les temps sont exprimés en minutes.

suit ensuite régulièrement et devient progressivement asymptote à la droite représentant l'absorption théorique.

L'opération a duré 70 minutes et nous avons fixé les 9 litres 600 que prévoyait la théorie.

Nous filtrons alors notre liqueur alcoolique afin de séparer le nickel RANEY platiné, et nous la soumettons à la distillation pour obtenir à l'état pur du β -hydroxybutyrate d'éthyle.

Distillation. — Nous soumettons le liquide à une distillation fractionnée permettant d'éliminer l'alcool, l'eau ; puis, à 178-179° ; le β -hydroxybutyrate d'éthyle distille (1).

Nous arrêtons l'opération lorsque les trois quarts de la liqueur alcoolique ont été distillés (2).

Nous avons mesuré la densité du corps obtenu et son indice de saponification.

Densité. — Nous avons effectué à 0° trois mesures qui nous ont donné les chiffres suivants :

1,02876. — 1,0290. — 1,0292 : soit une moyenne de 1,029 (3).

Indice de Saponification. — Nous l'avons déterminé en portant à l'ébullition pendant une heure (durée suffisante pour une saponification totale) une solution alcoolique de β -hydroxybutyrate d'éthyle avec une solution titrée de soude. Nous avons toujours trouvé des valeurs entachées d'une légère erreur par excès :

457,5. — 458,1. — 447,7 au lieu de la théorie 424,2.

Nous supposons que notre ester contenait peut-être un peu d'acétylacétate d'éthyle décomposé par l'alcali en deux molécules d'acide acétique et une d'alcool.

Il ne se forme pas d'acétone au cours de la saponification : le liquide saponifié soumis à une distillation n'a pas fourni les réactions de ce corps.

Après neutralisation de l'alcali en excès, nous avons dosé l'acide β -hydroxybutyrique par la technique de VAN SLYKE [56]. Nous avons

(1) VAYON [57] indique un point d'ébullition de 180-185°.

(2) Veiller à ce que le thermomètre n'atteigne pas 181°, point d'ébullition de l'acétylacétate d'éthyle.

(3) VAYON [57] indique 1,012.

en effet trouvé des chiffres légèrement inférieurs à la théorie, mais cette technique n'est pas assez précise pour tirer des conclusions d'aussi faibles différences. Elle fournit des résultats toujours entachés d'une erreur par défaut.

B) PRÉPARATION DU β -HYDROXYBUTYRATE DE BARYUM A PARTIR DU β -HYDROXYBUTYRATE D'ÉTHYLE

Dans la majeure partie de nos essais nous avons utilisé :

1° du β -hydroxybutyrate de sodium mis à notre disposition par M. P. FLEURY ;

2° du β -hydroxybutyrate de baryum que nous avons préparé en assez grande quantité par saponification barytique du β -hydroxybutyrate d'éthyle.

Ces deux sels présentent sur l'acide β -hydroxybutyrique, que l'on trouve dans le commerce à l'état sirupeux, l'avantage de pouvoir être nettement définis par dosage de l'ion *Na* ou de l'ion *Ba*. De plus, l'acide β -hydroxybutyrique libre s'auto-estérifie comme l'acide lactique.

Voici comment nous préparons le sel de baryum :

5 grs 28 de β -hydroxybutyrate d'éthyle sont introduits dans un ballon et nous ajoutons 80 cm³ de baryte N (double de la quantité théorique nécessaire). L'alcool dissolvant fort peu de baryte, nous sommes obligés d'employer de l'eau de baryte à saturation dont nous mesurons le titre et d'ajouter un égal volume d'alcool à 90°.

Nous portons une heure trente à l'ébullition au réfrigérant à reflux et nous laissons refroidir. Il y a bien précipitation d'un peu de baryte, précipitation due à l'alcool, mais nous l'éliminons par filtration. Nous amenons alors notre filtrat à un volume de 1.000 cm³ à l'aide d'eau distillée.

Nous neutralisons l'alcalinité par l'acide sulfurique N et éliminons par filtration le précipité de sulfate de baryum formé. Le filtrat est alors évaporé au bain-marie et le résidu de cette évaporation repris par un peu d'eau chaude. Le liquide de filtration, absolument limpide, est évaporé jusqu'à siccité dans un cristalliseur taré.

Nous avons obtenu 6 grs 55 de corps alors que la théorie en prévoyait 6 grs 86. C'est une laque transparente, de couleur brun-clair, qui

s'effleurit après un abandon de 24 heures à l'air libre et se transforme en une masse blanc-crèmeux que nous homogénéisons par broyage au mortier.

Notre β -hydroxybutyrate de baryum ainsi obtenu renferme encore des traces d'humidité que nous éliminons par passage dans l'appareil de BOUILLOT à dessiccation à chaud dans le vide : la déshydratation totale s'opère alors sans provoquer d'altération.

Nous avons finalement obtenu une poudre très fine et presque blanche que nous conservons dans un flacon bien sec bouchant à l'émeri car elle est très hygroscopique.

Le dosage du baryum effectué sur ce sel, tant par voie humide que par calcination selon les techniques classiques accuse un pourcentage en baryum de 38,92 au lieu de 39,94 (théorie).

Nous avons également dosé, à l'état de sulfate de sodium, le sodium dans le β -hydroxybutyrate de sodium en opérant par calcination, et nous avons trouvé dans le sel desséché un pourcentage en sodium de 17,90 (théorie : 18,25).

Nous avons utilisé ces deux sels en solution aqueuse et avons conservé ces dernières sous xylol.

CHAPITRE II

ACTION DES SOLUTIONS NITROCHROMIQUES SUR L'ACIDE β -HYDROXYBUTYRIQUE

Introduction. — Nous avons indiqué plus haut que les techniques classiques de dosage de l'acide β -hydroxybutyrique utilisaient l'oxydation sulfochromique de cet acide en acétone. Cette réaction n'est jamais totale : une partie de l'acide β -hydroxybutyrique est transformée en acide acétique soit, directement, par décomposition d'une molécule d'acide β -hydroxybutyrique en deux molécules d'acide acétique, soit par oxydation chromique de l'acétone formée.

L'action des solutions chromiques acides est fonction de leur concentration et des conditions opératoires : température d'oxydation et durée.

Un intéressant perfectionnement à la chromométrie a été apporté en 1939 par CORDEBARD [11] avec l'emploi des solutions nitrochromiques : solutions de bichromate de potassium dans l'acide nitrique. Voici ce qu'écrivait CORDEBARD à ce sujet :

« Ce mélange d'oxydants ne paraît, à première vue, présenter aucun avantage sur les solutions chromiques dans les acides minéraux fixes dont le point d'ébullition est plus élevé. Personnellement j'ai partagé cette idée préconçue jusqu'au jour où je me suis rendu compte des avantages que présentent ces solutions pour certains dosages. »

« Ce pouvoir oxydant est sensiblement comparable à celui des mélanges sulfochromiques de même acidité. »

« Un des gros avantages des solutions nitrochromiques est de permettre de préparer à l'avance des liqueurs titrées oxydantes normales, et même plusieurs fois normales, non visqueuses et de mesure facile. »

L'emploi de solutions nitrochromiques présente certains avantages sur celui de solutions sulfochromiques. C'est ainsi que les composés de la série aliphatique, facilement oxydables par les solutions chromiques de concentration sulfurique modérée, le sont plus rapidement

encore par les solutions nitrochromiques à égalité d'acidité et de température. Par contre, pour les substances organiques difficilement oxydables en CO^2 et OH^2 , il y a moins d'intérêt à utiliser les solutions nitrochromiques. Enfin, l'oxydation nitrochromique des composés aromatiques est à déconseiller par suite des réactions secondaires de nitration du noyau.

Le mélange nitrochromique a apporté une solution élégante au dosage de l'alcool éthylique. Ce dernier n'est oxydé qu'à chaud par les solutions sulfochromiques et la réaction est irrégulière car il se forme à côté de l'acide acétique, produit principal, de l'anhydride carbonique, de l'aldéhyde éthylique, de l'acétal, de l'acétate d'éthyle, de l'éther. Le pourcentage de ces corps est variable selon les conditions opératoires. Au contraire, la solution nitrochromique l'oxyde complètement et régulièrement en acide acétique en quelques minutes à la température du laboratoire. Cette technique a permis de doser l'alcool dans le chloroforme anesthésique CORDEBARD [11] et dans le sang (F. POSTIC, J. COURTOIS et J. RABATÉ [49]).

CORDEBARD a également montré que la solution nitrochromique permettait le dosage régulier de l'oxyde d'éthyle et de l'acide lactique.

L'acide β -hydroxybutyrique paraissant rentrer dans le groupe des corps facilement oxydables, nous avons étudié l'action des solutions nitrochromiques sur cet acide.

Réactifs utilisés. — Nous nous sommes servis pour nos essais de la solution décimale de bichromate de potassium dans l'acide nitrique officinal, préparée par dissolution à la température ordinaire de 49 grs 03 de bichromate de potassium pur dans assez d'acide nitrique pur pour obtenir un litre de solution. La dissolution, par agitation, est très rapide et l'on obtient « une liqueur d'un beau rouge-brome dont l'acidité est comparable à celle d'une solution acide treize fois normale » (CORDEBARD).

Une telle solution demeure rigoureusement stable après 24 heures (POSTIC, COURTOIS et RABATÉ [49]) à condition d'être conservée dans du verre jaune car la lumière vive réduit les solutions nitrochromiques de faible titre.

Cette solution a été diluée dans l'acide nitrique pour être environ N/10. Conservée dans un flacon en verre jaune placé le plus souvent possible dans un placard obscur elle évolue durant les premières 24 heures et demeure ensuite très stable.

Principe de la technique. — L'oxydation achevée, le produit de la réaction est versé dans une solution d'iodure de potassium, et l'iode, mis en liberté proportionnellement à la quantité de réactif nitrochromique restant, est titré par l'hyposulfite de soude N/10 en présence d'un peu d'empois d'amidon.

Technique. — Dans un Erlenmeyer bouchant à l'émeri, lavé soigneusement à la solution nitrochromique pour le débarrasser de toute substance susceptible de réduire l'oxydant, puis rincé plusieurs fois à l'eau distillée, nous mesurons successivement :

1° la solution à doser ;

2° 10 cm³ de réactif nitrochromique environ N/10.

Après un temps de contact variable, à la température du laboratoire ou après chauffage au bain-marie bouillant, nous ajoutons 40 cm³ d'eau distillée. Le liquide ainsi dilué est alors versé dans un vase contenant un gramme d'iodure de potassium dans 100 grs d'eau (pour plus de commodité et pour ne pas avoir à peser à chaque fois l'iodure, nous mettrons 5 cm³ d'une solution d'iodure de potassium à 20 p. 100 et 95 cm³ d'eau).

Comme l'a indiqué CORDEBARD, avec une telle acidité la libération d'iode est presque totalement immédiate. Après cinq minutes nous titrons l'iode libéré par l'hyposulfite de soude N/10 en présence d'empois d'amidon ⁽¹⁾.

Un essai témoin, en substituant de l'eau distillée à la substance à oxyder, permet de titrer la solution nitrochromique. La différence entre les deux dosages correspond à l'oxydant N/10 réduit au cours de l'opération.

Nous avons tout d'abord fait quelques essais préliminaires qui nous ont permis de conclure à l'attaque rapide de l'acide β -hydroxybutyrique par le réactif en question.

L'oxydation nitrochromique est particulièrement influencée par les modalités opératoires : concentration en acide, température, durée de chauffe, et c'est pourquoi nous avons fait des essais en fonction de ces trois facteurs (tableaux I et II).

⁽¹⁾ Ce virage est un peu particulier par suite de la teinte bleu-vert des sels de sesquioxyde de chrome, mais avec un peu d'habitude il est aussi facile à saisir que celui d'une solution iodée ordinaire.

TABLEAU I.

Oxydation du β -hydroxybutyrate de sodium par la solution nitrochromique en fonction de la concentration en corps et du temps de contact.

Température	Essais à la température du laboratoire ⁽²⁾							Essais au bain-marie bouillant	
Temps de contact	1'	2'	10'	1 h.	24 h.	48 h.	7 j.	10'	1 h.
1 cm ³ solution M/100	1,00 (¹)	1,00	1,00	1,00	1,10	1,10		1,00	1,00
2 cm ³ solution M/100	1,85	1,85	1,85	1,90	2,00	2,00		1,95	2,00
3 cm ³ solution M/100	2,70	2,75	2,90	3,00	3,05	3,05		2,95	3,00
5 cm ³ solution M/100	4,15	4,30	4,55	4,85	5,00	5,10		4,95	5,00
1 cm ³ solution M/10	8,50	8,85	9,25	9,75	10,35	10,35	10,30	10,10	10,10

(¹) Les chiffres indiquent le nombre de cm³ de solution nitrochromique N/10 réduits.

(²) Dans nos essais, voisine de 26°.

TABLEAU II.

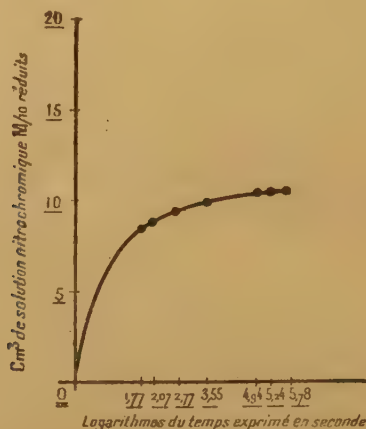
Oxydation du β -hydroxybutyrate de baryum par la solution nitrochromique en fonction de la concentration en corps et du temps de contact.

Température	Essais à la température du laboratoire ⁽²⁾							Essais au bain-marie bouillant	
Temps de contact	1'	2'	10'	1 h.	24 h.	48 h.		10'	1 h.
4 cm ³ sol. acide β — M/100	(¹) 3,30	3,45	3,50	3,75	3,90			3,90	4,00
6 cm ³ sol. acide β — M/100	4,75	5,00	5,25	5,50	5,85			5,85	5,90
1 cm ³ sol. acide β — M/10	7,35	7,95	8,55	9,00	9,70	9,70		9,55	9,75

(¹) Les chiffres indiquent le nombre de cm³ de solution nitrochromique N/10 réduits.

(²) Dans nos essais, voisine de 26°.

Nous avons schématisé par la courbe n° II l'action de 10 cm³ de réactif nitrochromique N/10 sur 1 cm³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique M/10 en fonction du temps en utilisant pour ce dernier les logarithmes du temps exprimé en secondes.



COURBE N° II.

Oxydation de 1 cm³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique M/10 par 10 cm³ de solution nitrochromique en fonction du temps.

Nos résultats permettent de tirer les déductions suivantes :

1. **Influence de la durée de contact.** — A la température ordinaire, l'attaque débute d'une façon brutale : il y a réduction, en une minute, de plus de 80 p. 100 de l'oxydant qui sera totalement réduit. Ne supposant pas avoir une oxydation aussi rapide, nous avons fait quelques essais avec 5 cm³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique M/10 : cette dernière réduit totalement en une minute la solution nitrochromique.

Comme le montre la courbe n° II, l'oxydation, très rapide au début, se poursuit beaucoup plus lentement comme si un des premiers produits d'oxydation était à son tour peu à peu oxydé. Des expériences ultérieures ont d'ailleurs montré qu'il devait s'agir vraisemblablement de l'acétone. Nous reviendrons sur ce fait.

2. **En opérant dans un bain-marie bouillant**, nous avons, en dix minutes, de 95 à 98 p. 100 de la réduction finalement obtenue soit en

48 heures à la température du laboratoire soit en une heure à 100°.

Lorsque nous avons utilisé 2 et 5 cm³ de solution d'acide β-hydroxybutyrique M/10, tout le chrome hexavalent est réduit et l'acide nitrique attaque les corps formés en dégageant des vapeurs nitreuses.

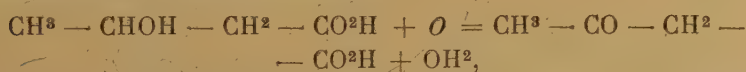
3. La vitesse d'oxydation est d'autant plus rapide qu'il y a un plus grand excès d'oxydant par rapport à l'acide β-hydroxybutyrique. Cette observation corrobore celles faites par CORDERARD en opérant sur d'autres corps avec des solutions chromiques dans divers acides.

4. Avec diverses doses d'acide β-hydroxybutyrique, après 48 h. à 26° ou 1 h. à 100°, la quantité d'oxydant réduit est directement proportionnelle à celle d'acide β-hydroxybutyrique. Un cm³ d'acide β-hydroxybutyrique M/10 réduit en moyenne 10 cm³ de solution nitrochromique N/10.

Il y a donc 5 atomes d'oxygène fixés par l'acide β-hydroxybutyrique et ses produits intermédiaires d'oxydation. Comment peut-on se représenter ces réactions ?

En nous basant sur le mécanisme habituel de l'oxydation chromique nous avons envisagé le schéma suivant :

L'acide β-hydroxybutyrique serait d'abord oxydé en acide acétylacétique avec mise en liberté d'une molécule d'eau. Cette supposition paraît la plus vraisemblable si l'on en juge par l'action d'autres oxydants : solution sulfochromique [SCHAFER (53), VAN SLYKE (56)], iodomercurate alcalin (chapitre IV) :



puis ce nouvel acide instable est décarboxylé en acétone et anhydride carbonique :



L'acétone est oxydée à son tour en acide acétique et en un radical méthylène qui, ne pouvant exister à l'état libre, se combine à 2 O pour donner



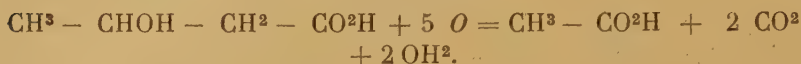
une molécule d'acide formique :



Enfin cet acide formique utilise le cinquième *O* théorique pour se décomposer en eau et anhydride carbonique :



et la réaction totale peut s'exprimer ainsi :



Nous aurions donc finalement de l'acide acétique et de l'eau avec dégagement d'anhydride carbonique. Il nous est malheureusement impossible de caractériser cet acide acétique qui n'existe qu'à l'état de traces à côté de la grande quantité d'acide nitrique.

Ces considérations théoriques sont étayées par le fait que les solutions chromiques acides fournissent comme principaux produits d'oxydation :

1. **De l'acide acétique.** — Ce dernier n'est pas oxydé à la température ordinaire par la solution nitrochromique. C'est ce corps qui se forme avec régularité par action de la solution nitrochromique sur l'alcool éthylique et l'acide lactique (CORDEBARD).

2. **De l'acide formique.** — CORDEBARD a montré que l'acide formique était totalement oxydé par une solution nitrochromique à la température du laboratoire : 99 p. 100 en 5 minutes et 100 p. 100 en 30 minutes. L'oxydation nitro-chromique est complète et régulière alors qu'avec certaines solutions sulfochromiques à chaud il tend au contraire à se dégager de l'oxyde de carbone à partir de l'acide formique.

Nôtre interprétation est cependant justiciable d'une grave critique: l'acétone est lentement et difficilement oxydable en acide acétique par les solutions chromiques, même à température élevée et en catalysant la réaction par les sels d'argent. A la température ordinaire, CORDEBARD, opérant avec la solution nitrochromique, n'en a oxydé que 1 p. 100 en une heure, et à 100° 7 p. 100 en 20 minutes.

POSTIC, COURTOIS et RABATÉ [49] ont d'ailleurs confirmé ces données. L'avantage de la technique qu'ils ont proposée pour doser l'alcool du sang réside précisément dans ce fait que le distillat sanguin renferme de petites quantités d'acétone partiellement oxydables par les solutions sulfochromiques à 85° tandis que, dans la technique

nitrochromique que ces auteurs ont préconisée, l'acétone n'est pratiquement pas oxydée.

C'est ainsi que nous avons été amenés à

a) rechercher si une impureté de notre réactif ne catalysait pas l'oxydation de l'acétone ;

b) rechercher s'il y avait formation d'acétone comme produit intermédiaire de l'oxydation nitrochromique de l'acide β -hydroxybutyrique.

1. **Action du réactif nitrochromique sur l'acétone.** — Nous l'avons étudiée en faisant agir, durant des temps variables, à la température ordinaire et à 100°, 10 cm³ de réactif sur 5 puis 10 cm³ d'une solution d'acétone M/100, chaque centimètre cube correspondant par conséquent à 0,58 mgr. d'acétone (Tableau III).

TABLEAU III.

Action du réactif nitrochromique sur l'acétone.

Température	Temps de contact	Température du laboratoire (°)				Bain-marie à 100°	
		1'	10'	1 h.	24 h.	10'	1 h.
cm ³ de solution d'acétone M/100	5	0 (2)	0	0	0,2	0,4	0,5
	10	0	0	0	0,2	2,05	2,6

(1) Dans nos essais, voisine de 26°.

(2) Les chiffres indiquent le nombre de cm³ de solution nitrochromique N/10 réduits.

L'attaque à froid de l'acétone est donc pratiquement nulle et n'est que minime à 100°.

Nos résultats concordent parfaitement avec ceux de CORDEBARD [11], et de POSTIC, COURTOIS et RABATÉ [49].

II. **Recherche de l'acétone au cours de l'oxydation nitrochromique.** — Nous nous sommes efforcés de caractériser et de doser l'acétone qui, selon notre schéma, apparaît de façon transitoire.

Après un temps de contact variable, le mélange, renfermant les pro-

duits de la solution nitrochromique sur l'acide β -hydroxybutyrique, est additionné de 40 cm³ d'eau distillée, neutralisé par de la lessive de soude à 33° Bé en présence de tournesol (le mélange vire au vert dès la moindre alcalinité) et soumis à la distillation. Nous recueillons 30 cm³ de distillat où nous recherchons l'acétone par les réactions classiques de LEGAL [40], FROMMER [29], DENIGÈS [16] et ROTHÉRA [51] ⁽¹⁾. Nous l'avons également dosée par la méthode iodométrique classique.

Sur un premier essai à blanc, c'est-à-dire sur une solution de réactif nitrochromique sans acide β -hydroxybutyrique, les trois réactions ont été négatives et il n'y a eu aucune réduction d'iode en milieu alcalin.

Un second essai, pratiqué sur un mélange de réactif nitrochromique et de 2 cm³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique M/10 après 10 minutes de contact, nous a donné des résultats *positifs*.

Nous avons ensuite fait deux séries d'expériences, chacune des deux comportant l'attaque d'une même quantité d'acide β -hydroxybutyrique par 10 cm³ de réactif nitrochromique. Après un temps de contact variable, l'acétone séparée par distillation est dosée par iodométrie (Tableau IV).

TABLEAU IV.

Dosage de l'acétone formée au cours de l'oxydation nitrochromique.

Temps de contact		1'	10'	1 h.
cm ³ d'acide β -hydroxybutyrique M/10 utilisés	1	0,367 ⁽¹⁾	0,029	0
	2	1,721	1,690	1,586
⁽¹⁾ Nous avons exprimé en milligrammes d'acétone les résultats trouvés.				
1 cm ³ d'acide β -M/10 oxydé en acétone donne 5,8 mgrs. d'acétone.				

Avec 1 cm³ d'acide, l'oxydant se trouve en excès et l'acétone

(1) Cette dernière réaction (nitroprussiate en milieu ammoniacal saturé de sulfate d'ammonium) est beaucoup plus sensible que celle de LEGAL.

diminue avec le temps, ce qui prouve bien que la solution nitrochromique oxyde l'acétone formée comme produit intermédiaire.

Au contraire, avec 2 cm³ d'acide, l'oxydant est en quantité insuffisante et la quantité d'acétone ne diminue que faiblement.

Une hypothèse logique est que l'acétone apparaît sous une forme naissante oxydable par la solution nitrochromique.

Avant de nous en tenir à cette interprétation, nous nous sommes demandés si la solution nitrochromique n' « entraîne » pas l'oxydation d'acétone. Cette supposition apparaît peu vraisemblable, mais nous avons cependant étudié l'action de la solution nitrochromique sur un mélange « acide β -hydroxybutyrique-acétone ».

* * *

Dosage de l'acide β -hydroxybutyrique en présence d'acétone. — Nous avons fait quelques essais sur des mélanges de ces deux solutions en faisant varier les quantités et les temps de contact. Pour mieux nous rendre compte des résultats, nous avons opéré concurremment sur chacune des deux solutions entrant dans le mélange en ajoutant de l'eau en quantité suffisante pour avoir une concentration identique à celle du mélange (Tableau V).

Cette fois la réduction de l'acide β -hydroxybutyrique est incomplète (d'un cinquième environ) mais il faut attribuer ce ralentissement à la dilution des mélanges qui est plus grande que de coutume. Nous reviendrons par la suite sur l'influence de la dilution.

Puisque l'acide β -hydroxybutyrique n'entraîne pas l'oxydation de l'acétone, nous avons recherché si cette acétone, que nous considérons sous une forme naissante oxydable par la solution nitrochromique, est stable ; en d'autres termes, si elle conserve la propriété d'être oxydée par la solution nitrochromique. Nous avons opéré de la façon suivante :

Nous mettons en contact de l'acide β -hydroxybutyrique avec une quantité de solution nitrochromique insuffisante pour l'oxyder totalement (conditions favorables à la formation d'acétone). Après 24 h., nous séparons par distillation et dosons l'acétone formée.

Sur un essai parallèle, au lieu de distiller l'acétone au bout de 24 h., nous ajoutons à ce moment du nouvel oxydant. Si l'acétone est restée sous sa forme naissante, elle sera oxydée totalement ; au contraire, si l'acétone a évolué sous sa forme ordinaire, elle ne sera que faible-

TABLEAU V.

*Action de la solution nitrochromique
sur l'acide β -hydroxybutyrique en présence d'acétone.*

	Temps de contact	1'	1 h.	24 h.
1 ^{re} série	3 cm ³ acide β -hydroxybut. M/100 + 10 cm ³ eau	0,85 (1)	2,45	2,75
	10 cm ³ solution acétone à 0 gr. 58 ‰ + 3 cm ³ eau	0	0	0,15
	3 cm ³ acide β -hydroxybut. M/100 + 10 cm ³ solution acétone à 0 gr. 58 ‰	0,95	2,50	2,85
2 ^e série	5 cm ³ acide β -hydroxybut. M/100 + 10 cm ³ eau	1,20	4,0	3,80
	10 cm ³ solution acétone à 0 gr. 58 ‰ + 5 cm ³ eau	0	0	0,05
	5 cm ³ acide β -hydroxybut. M/100 + 10 cm ³ solution acétone à 0 gr. 58 ‰	1,15	4,0	3,90
3 ^e série	10 cm ³ acide β -hydroxybut. M/100 + 10 cm ³ eau	1,20	4,55	7,55
	10 cm ³ solution acétone à 0 gr. 58 ‰ + 10 cm ³ eau	0	0	0,05
	10 cm ³ acide β -hydroxybut. M/100 + 10 cm ³ solution acétone à 0 gr. 58 ‰	1,15	4,55	7,45

(1) Nos chiffres sont exprimés en cm³ de solution nitrochromique N/10 réduits.

ment oxydée. Après à nouveau 24 h. de contact, nous dosons après distillation l'acétone qui subsiste. Pour certains essais avec de fortes doses d'acide β -hydroxybutyrique, nous avons fait plusieurs affusions successives de solution nitrochromique toutes les 24 h.

Pour réaliser ces expériences, nous prenons deux flacons A et B et mesurons dans chacun d'eux 2 cm³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique M/10 et 10 cm³ de solution nitrochromique N/10. Après

24 h. de contact à la température du laboratoire, nous titrons dans le flacon A l'acétone par distillation et iodométrie.

Dans le flacon B nous ajoutons à nouveau 10 cm³ de solution nitrochromique et après un nouveau contact de 24 h. nous dosons l'acétone.

Avec 4 cm³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique M/10 nous avons opéré de façon analogue en utilisant à l'origine quatre flacons A, B, C, D et faisant un dosage d'acétone tous les 24 h. pendant 4 jours (Tableau VI).

TABLEAU VI.

Action de la solution nitrochromique sur l'acide β -hydroxybutyrique et dosage de l'acétone formée par iodométrie après distillation, pour des temps de contact différents.

Temps de contact avec l'oxydant		Flacon A 24 h.	Flacon B 48 h.	Flacon C 3 jours	Flacon D 4 jours
cm ³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique M/10 mis en œuvre	2	1,547 ⁽¹⁾	0,750		
	4	5,348	5,348		
	4	5,310	5,410	1,996	2,457

(¹) Les chiffres représentent le nombre de milligrammes d'acétone dosés par iodométrie après distillation.

Les résultats ne sont pas absolument démonstratifs, ils montrent cependant que l'acétone formée en utilisant une quantité insuffisante de solution nitrochromique évolue après sa formation et n'est plus totalement oxydable par la solution nitrochromique : elle est donc passée de sa forme naissante oxydable à sa forme ordinaire qui n'est pratiquement pas oxydée dans nos conditions opératoires.

Cependant tout se passe comme s'il y avait un mélange des deux formes : avec 2 cm³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique M/10 la moitié de l'acétone formée disparaît en 24 heures. Cette oxydation est ainsi bien plus considérable que celle observée sur une solution d'acétone.

(¹) Un cm³ d'acide β -hydroxybutyrique M/10 réduit 10 cm³ de solution nitrochromique N/10 quand cette dernière est en excès.

Il en est de même après 3 et 4 jours avec 4 cm³ de solution d'acide β -M/10.

L'irrégularité des résultats semble montrer que le phénomène est très complexe.

Ainsi ces deux résultats tendent à prouver que l'oxydation de l'acide β -hydroxybutyrique par la solution nitrochromique s'effectue selon le schéma que nous avons proposé.

Si nous comparons l'oxydation de l'acide β -hydroxybutyrique par la solution nitrochromique et par la solution sulfochromique, nous remarquons :

1^o que l'oxydation nitrochromique est bien plus rapide que la sulfochromique. Il paraît difficile de capter l'acétone qui se forme tandis que c'est chose facile dans la sulfochromique (sulfate mercurique dans la technique de VAN SLYKE).

2^o que l'oxydation nitrochromique est bien plus régulière que la sulfochromique qui, dans les meilleures conditions, fournit tout au plus 80 p. 100 de l'acétone qui devrait se former.

L'oxydation nitrochromique réalisant rapidement à froid une véritable combustion par voie humide de l'acide β -hydroxybutyrique, nous avons fait quelques essais complémentaires pour voir la précision et la sélectivité de notre technique.

Nos essais antérieurs ayant été réalisés sur des solutions concentrées d'acide β -hydroxybutyrique, nous avons tout d'abord étudié l'action de la solution nitrochromique sur des solutions diluées de ce même acide.

Enfin nous avons fait réagir ce réactif sur des corps en C³ et C⁴ se rapprochant de l'acide β -hydroxybutyrique.

Influence de la dilution. — Nous avons déjà constaté (Tableau V), lors de l'attaque par la solution nitrochromique d'un mélange « acétone-acide β -hydroxybutyrique », que l'oxydation de ce dernier corps était plus lente et moins complète, pour un temps donné, quand la concentration du mélange était moins grande.

Nous avons confirmé ce fait en faisant agir pendant une minute 10 cm³ de solution nitrochromique sur des quantités déterminées d'acide β -hydroxybutyrique, puis sur des quantités identiques en solutions plus diluées par addition de 10 cm³ d'eau par essai (Tableau VII).

CORDEBARD signale d'ailleurs ce fait comme général à l'oxydimétrie, et POSTIC, COURTOIS et RABATÉ l'ont observé avec l'alcool éthylique.

TABLEAU VII.

Action de la solution nitrochromique sur l'acide β -hydroxybutyrique en fonction de la dilution.

Nombre de cm ³ de solution d'acide β -hydroxybut. M/100 mis en œuvre	3	5	10
Solution d'acide β -hydroxybutyrique M/100	2,45 ⁽¹⁾	3,60	4,55
La même solution avec en plus 10 cm ³ d'eau par essai	0,85	1,20	1,20

(¹) Les chiffres indiquent le nombre de cm³ de solution nitrochromique N/10 réduits en 1 minute en présence de 10 cm³ de solution nitrochromique environ N/10.

Action de la solution nitrochromique sur quelques autres corps voisins de l'acide β -hydroxybutyrique. — Dans le but de voir la sélectivité de l'attaque de l'acide β -hydroxybutyrique par le réactif nitrochromique, nous avons étudié l'action de ce réactif sur un certain nombre de corps voisins du dit acide en faisant agir 10 cm³ de notre réactif sur 1 cm³ de solution M/10 de chacun de ces corps, ou moins quand cela a été jugé nécessaire, de formule et de poids moléculaire suivant :

Acide β -hydroxybutyrique $\text{CH}^3\text{—CHOH—CH}^2\text{—CO}^2\text{H}$	P. M. : 104
Acide α -hydroxybutyrique $\text{CH}^3\text{—CH}^2\text{—CHOH—CO}^2\text{H}$	P. M. : 104
Acide butyrique $\text{CH}^3\text{—CH}^2\text{—CH}^2\text{—CO}^2\text{H}$	P. M. : 88
Acide β -oxypropionique $\text{CH}^2\text{OH—CH}^2\text{—CO}^2\text{H}$	P. M. : 90
Diéthylcétone $\text{CH}^3\text{—CH}^2\text{—CO—CH}^2\text{—CH}^3$	P. M. : 86
Méthyléthylcétone $\text{CH}^3\text{—CO—CH}^2\text{—CH}^3$	P. M. : 72
β -hydroxybutyrate d'éthyle $\text{CH}^3\text{—CHOH—CH}^2\text{—CO}^2\text{—C}^2\text{H}^5$	P. M. : 132
Acétylacétate d'éthyle $\text{CH}^3\text{—CO—CH}^2\text{—CO}^2\text{—C}^2\text{H}^5$	P. M. : 130
Acide acétylacétique libre $\text{CH}^3\text{—CO—CH}^2\text{—CO}^2\text{H}$	P. M. : 102

Si nous comparons les résultats trouvés avec ceux fournis par l'acide

β -hydroxybutyrique (Tableau VIII et Graphique II) nous pouvons faire les déductions suivantes :

a) Les acides α -hydroxybutyrique et β -oxypropionique sont attaqués de façon insignifiante, même à 100°.

Cette attaque est encore plus faible avec la diéthylcétone et la méthyléthylcétone.

L'acide butyrique n'est pas attaqué.

b) Les esters éthyliques sont attaqués, vraisemblablement après libération de l'alcool qui est oxydé.

TABLEAU VIII

Action de la solution nitrochromique sur quelques corps voisins de l'acide β -hydroxybutyrique.

Température		Température du labo (24°)			Bain-marie à 100°	
		1'	1 h.	24 h.	10'	1 h.
1 cm ³ de solution M/10.	Acide β -hydroxybutyrique.....	8,50 (¹)	9,25	10,35	10,10	10,10
	Acide α -hydroxybutyrique	0,50	2,20	3,65	3,80	3,70
	Acide butyrique	0	0	0	0	0
	Acide β -oxypropionique (²).....	0,10	0,75	2,40	3,50	5,30
	Diéthylcétone.....	0	0	0,40	0,90	3,10
	Méthyléthylcétone.....	0	0,05	0,40	1,50	3,50
	β -hydroxybutyrate d'éthyle (³)...	2,70	8,10	↗	9,95	↗
	Acétylacétate d'éthyle (³)	0,55	6,30	9,40	9,30	9,50
	Acide acétylacétique libre (³)	6,50	9,75	11,05	10,45	11,0

(¹) Les chiffres représentent le nombre de cm³ de solution nitrochromique réduits.

(²) CORDEBARD a étudié l'oxydation de l'acide α -oxypropionique (acide lactique) et trouvé qu'il fallait 4 cm³ de solution nitrochromique N/10 pour oxyder totalement, en 5 minutes à 100°, 9 mgrs de cet acide.

(³) La propre réduction de l'alcool n'a pas été retranchée. Ces trois esters sont en solutions aqueuses ; nous en prélevons une dose correspondante à 1 cm³ d'ester M/10.

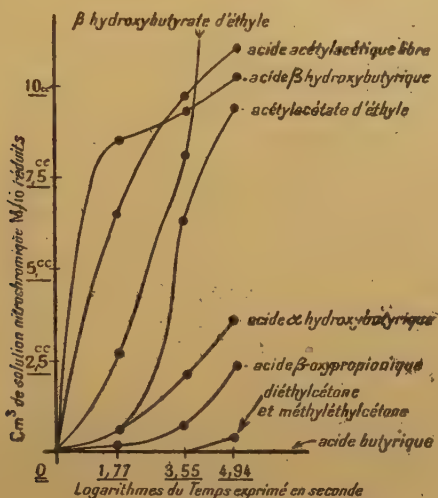
Avec l'acétylacétate d'éthyle et ses produits de saponification (¹) à froid, tout l'oxydant est réduit : nous avons alors effectué des essais

(¹) Préparation de l'acide acétylacétique libre selon la technique P. FLEURY et CARBOU (23) : Dans une fiole jaugée de 250 cm³ introduire

avec une plus faible dose de corps et tenu compte de l'action réductrice de l'alcool. CORDEBARD a montré que l'alcool est oxydé régulièrement en acide acétique par la solution nitrochromique selon l'équation :



1 cm³ d'alcool M/10 réduit donc 4 cm³ de solution nitrochromique N/10.



GRAPHIQUE N° II.

Oxydation de 1 cm³ de solution M/10 de différents corps, voisins de l'acide β-hydroxybutyrique, par 10 cm³ de solution nitrochromique en fonction du temps.

Opérant sur 1 cm³ de chacun de ces esters M/10, la réduction était trop forte pour pouvoir retrancher l'alcool oxydé et nous avons dû

successivement : Acétylacétate d'éthyle 6 grs 50 ; soude N 50 cm³ ; eau distillée q. s. p. 250 cm³.

Agiter de temps en temps jusqu'à disparition de l'ester et laisser en repos 6 heures à la température du laboratoire. Au bout de ce temps la saponification est presque totale et l'on a une solution d'acétylacétate de sodium M/5 correspondant à environ 1 gr. 16 p. 100 d'acétone. La diluer au demi afin de l'amener à M/10 (soit environ 0 gr. 58 p. 100 d'acétone). Conserver cette solution à la glacière.

commencer par n'opérer que sur 0 cm³ 50 de solution M/10 (Tableau IX).

TABLEAU IX

Action de la solution nitrochromique sur quelques esters voisins de l'acide β -hydroxybutyrique.

5 cm ³ de solution aqueuse M/10	Température Temps de contact	Température du laboratoire 24°			Bain-marie à 100°	
		1'	1 h.	24 h.	10'	1 h.
{	β -hydroxybutyrate d'éthyle ...	4,65 ⁽²⁾	5,05	6,45	6,50	6,65
	Acétylacétate d'éthyle	0,30 ⁽¹⁾	3,80	5,45	5,55	5,60
	Acide acétylacétique libre ⁽³⁾ ..	3,35	5,25	5,50	5,40	5,45

(¹) Chiffres exprimés en cm³ de solution nitrochromique N/10 réduits.
 (²) La propre réduction de l'alcool n'est pas retranchée.
 (³) La solution d'acide acétylacétique contient l'alcool provenant de la saponification de l'ester.

Ainsi, si nous retranchons la réduction due à l'alcool (1/2 molécule = 2 cm³), une molécule de β -hydroxybutyrate d'éthyle fixe 4,45 atomes d'oxygène à 24° et 4,65 à 100° ; une d'acétylacétate d'éthyle 3,45 à 24° et 3,6 à 100°.

Le fait le plus significatif est la différence d'un atome d'oxygène entre le β -hydroxybutyrate d'éthyle et l'acétylacétate d'éthyle, ce qui semble bien montrer l'exactitude de notre schéma d'oxydation, et que cet atome d'oxygène sert précisément à transformer le β -hydroxybutyrate en acétylacétate.

D'autre part nous pouvons constater que l'acétylacétate d'éthyle est plus lentement attaqué que l'acide acétylacétique préalablement libéré par la soude.

L'attaque de ces trois corps est moins complète que celle de l'acide β -hydroxybutyrique, en moyenne 1/2 atome d'oxygène en moins fixé après 24 heures à 24° ou une heure à 100°.

Technique proposée pour le dosage de l'acide β -hydroxybutyrique en solutions pures. — A la suite de nos essais, nous propo-

sons la technique suivante de dosage de l'acide β -hydroxybutyrique en solutions pures :

Dans un Erlenmeyer lavé au préalable à la solution nitrochromique puis rincé à l'eau distillée mesurer successivement :

1° de 1 à 10 cm³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique à doser (renfermant de 1 à 8 mgrs d'acide).

2° 10 cm³ de solution nitrochromique N/10.

Après un temps de contact de 24 heures à la température du laboratoire ou de 1 heure au bain-marie à 100°, ajouter 40 cm³ d'eau distillée. Le liquide dilué est alors versé dans un vase renfermant 5 cm³ d'une solution d'iodure de potassium à 20 p. 100 et 95 cm³ d'eau.

Après 5 minutes de contact, titrer l'iode libéré par de l'hyposulfite de sodium N/10 en présence d'empois d'amidon : soit n' .

Opérer parallèlement avec un témoin en remplaçant la solution à titrer par de l'eau distillée : soit n .

La différence $n - n'$ nous donne la quantité de solution nitrochromique N/10 réduite.

Sachant que 1 cm³ de solution nitrochromique N/10 réduit totalement 1,04 mgr. d'acide β -hydroxybutyrique, il suffit de multiplier le nombre de centimètres cubes de solution nitrochromique N/10 réduits par le coefficient 0,00104 pour connaître la quantité d'acide β -hydroxybutyrique en grammes contenue dans la prise d'essai.

Voici les résultats que nous avons obtenus avec une solution titrée dont on nous avait préparé des dilutions (Le titre nous fut communiqué après le dosage) (Tableau X).

TABLEAU X

Dosage de solutions pures d'acide β -hydroxybutyrique par la solution nitrochromique.

		N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6	N° 7	N° 8
Milligrammes d'acide β -hydroxybutyrique	trouvés	1,92	2,72	4,96	5,01	7,04	10,07	10,30	10,45
	théoriques	2,08	2,60	5,20	5,20	7,28	10,40	10,40	10,40
Erreur p. 100		-7,7	+4,65	-4,60	-3,60	-3,20	-3,20	-0,96	+0,48

Nos résultats montrent qu'en solutions pures l'acide β -hydroxybutyrique peut être dosé avec une précision de 3 à 4 p. 100.

Conclusions du chapitre II. — En solutions pures, l'acide β -hydroxybutyrique est facilement oxydé par la solution nitrochromique en le maintenant en contact, soit 24 h. à la température ordinaire, soit 1 h. à 100°, ce dernier *modus operandi* présentant l'avantage de fournir une oxydation plus complète et plus rapide.

Ce dosage peut également se faire en présence d'acétone mais il est alors indispensable d'opérer à la température ordinaire.

Une molécule d'acide β -hydroxybutyrique fixe cinq atomes d'oxygène et l'oxydation nitrochromique réalise une combustion par voie humide amenant l'acide β -hydroxybutyrique à l'état d'eau, d'anhydride carbonique et probablement d'acide acétique.

Nous n'avons pas cherché à appliquer cette méthode de dosage de l'acide β -hydroxybutyrique à l'urine car cette dernière renferme trop de substances oxydables par la solution nitrochromique. Il faudrait alors faire au préalable une extraction étherée et il est plus simple à ce moment de faire sur l'extractum un dosage polarimétrique.

CHAPITRE III (1)

ACTION DE L'ACIDE PERIODIQUE SUR L'ACIDE β -HYDROXYBUTYRIQUE

Introduction. — MALAPRADE [44], P. FLEURY et LANGE [24] ont montré qu'à la température ordinaire l'acide periodique oxyde les sucres et les polyols en rompant les liaisons glycol. Avec les sucres et les polyols linéaires, les fonctions alcool primaire donnent de l'aldéhyde formique et les fonctions alcool secondaire de l'acide formique.

A 100° l'oxydant est moins spécifique et peut attaquer deux acides mixtes : les acides lactique et pyruvique [P. FLEURY et M^{lle} BOISSON (22)] et l'acide tartronique [P. FLEURY (recherches inédites)].

En vue de compléter ces recherches effectuées pour la plus grande partie dans le laboratoire où nous avons travaillé, nous avons fait quelques essais d'oxydation periodique sur l'acide β -hydroxybutyrique.

Ces essais n'ont pas été concluants : pratiquement inaltéré à froid l'acide β -hydroxybutyrique n'est que difficilement attaqué à chaud et cette réaction, lente et incomplète, n'a pas permis de tirer des conclusions précises.

Nous décrirons donc succinctement nos essais qui témoignent surtout de la résistance de l'acide β -hydroxybutyrique à l'acide periodique.

Attaque de l'acide β -hydroxybutyrique en fonction du temps et de la température. — Nous avons opéré sur une solution au centième d'acide β -hydroxybutyrique pur et nous avons mis successivement dans un Erlenmeyer :

10 cm³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique à 1 p. 100 (correspondant à 0 gr. 10 d'acide),

10 cm³ d'acide periodique environ N/10,

2 cm³ d'acide sulfurique N.

Après un temps de contact variable, nous avons dosé l'acide periodique en excès selon la technique P. FLEURY et LANGE [24] à l'anhydride arsénieux et à l'iode.

Nous avons étudié cette attaque en fonction du temps et de la température, soit que nous opérions à la température du laboratoire, soit à l'étuve à 37°, soit enfin en plongeant dans un bain-marie bouillant l'Erlenmeyer renfermant les solutions et surmonté d'un petit réfrigérant à reflux pour maintenir la concentration constante.

Nos résultats ont été exprimés en centimètres cubes d'acide periodique N/10 réduits (Tableau XI).

TABLEAU XI.

Action de l'acide periodique sur l'acide β-hydroxybutyrique en fonction du temps et de la température.

Temps de contact Température	8 j. 20°	24 h. 37°	4 j. 37°	8 j. 37°	1 mois 37°	6 mois 37°	1 h. 100°	8 h. 100°
Cm ³ IO ³ H N/10 réduits par l'acide β-hydroxybutyrique	0	0,10	0,30	0,35	0,50	0,70	0,20	2,05

D'autre part, 1.000 cm³ d'acide periodique N/10 réduits équivalant au vingtième d'un atome d'oxygène, nous voyons que pour le meilleur résultat (8 h. au bain-marie bouillant) il n'y a eu qu'un dixième d'atome d'oxygène de consommé, ce qui est insignifiant. L'attaque, nulle en 8 jours à 20°, est minime à 37° et un peu plus rapide à 100°.

Attaque de l'acide β-hydroxybutyrique en fonction de la concentration en acide. — M^{lle} Boisson (7) a montré que la vitesse de la réaction d'attaque de l'acide periodique sur les acides lactique et pyruvique augmente avec l'acidité du milieu.

Nous avons pensé qu'il pouvait en être de même pour l'acide β-hydroxybutyrique et nous avons augmenté l'acidité en remplaçant

les 2 cm³ d'SO⁴H²N par 3 cm³ d'SO⁴H² à 20 p. 100 en volume. Les résultats obtenus (Tableau XII) prouvent qu'effectivement l'attaque est plus importante en milieu plus acide à condition toutefois d'opérer au bain-marie bouillant ou à l'étuve après séjour prolongé.

Ces résultats nous ont amenés à compléter ces essais par des oxydations prolongées à 100°.

TABLEAU XII.

*Action de l'acide periodique, en milieu très-acide,
sur l'acide β-hydroxybutyrique en fonction du temps et de la température.*

Temps de contact Température	4 jours 37°	8 jours 37°	1 mois 37°	8 heures 100°
Cm ³ d'acide periodique N/10 réduits par l'acide β-hydroxy- butyrique	0,30	0,30	2,15	5,70

Attaque de l'acide β-hydroxybutyrique en ampoules scellées au bain-marie bouillant. — Dans une ampoule en verre de 60 cm³ environ fermée à l'une des extrémités, nous avons versé, à l'aide d'une burette, le mélange des solutions habituelles mais en quantité double :

20 cm³ de solution d'acide β-hydroxybutyrique à 1 p. 100,

20 cm³ de solution periodique environ N/10,

4 cm³ de SO⁴H²N.

Nous avons scellé l'ampoule ; puis nous avons fait un témoin identique en remplaçant les 20 cm³ de solution d'acide β-hydroxybutyrique par 20 cm³ d'eau et avons disposé les deux ampoules dans un Erlenmeyer à large ouverture rempli aux trois-quarts d'eau colorée.

Nous avons fermé d'un bouchon sur lequel s'adaptait un réfrigérant et nous avons porté le tout à l'ébullition sur un réchaud électrique.

Au bout de 16 à 18 heures de chauffe, l'ampoule renfermant la solution d'acide β-hydroxybutyrique a pris une teinte rougeâtre avec émission de vapeurs violettes dans la partie supérieure de l'ampoule : il y a manifestement de l'iode en liberté. L'acide periodique a été réduit en acide iodique et l'acide iodique en iode. D'ailleurs il s'est déposé peu à peu des paillettes d'iode. Le témoin est demeuré incolore.

Au bout de 48 heures de chauffe, nous avons laissé refroidir et nous avons brisé l'ampoule qui renfermait la solution d'acide β -hydroxybutyrique dans une fiole de KITASATO après avoir éliminé les paillettes d'iode par filtration. Nous avons également éliminé l'iode, qui n'est pas dissous par de l'iodure, par un courant d'air sous pression réduite. Au bout de cinq minutes, la solution, privée de son iode, est devenue incolore.

Sur une prise d'essai de 22 cm³ de cette solution (correspondant à 10 cm³ de solution à 1 p. 100 d'acide β -hydroxybutyrique), nous avons dosé comme de coutume l'acide periodique en excès par comparaison avec le témoin demeuré incolore.

Tout l'acide periodique ayant été réduit (Solution : 15 cm³ et témoin : 6,7 cm³), nous avons réduit le temps de chauffe à 24 heures.

Au bout de 24 heures de chauffe, l'ampoule renfermant la solution d'acide β -hydroxybutyrique est seulement colorée en jaune mais cette fois encore il y a eu réduction totale de tout l'acide periodique.

Nous avons alors fait des essais similaires avec le *periodate de potassium*, en solution sulfurique, sensiblement M/20. Après 2 et 3 jours de chauffe les ampoules sont demeurées incolores ; mais avant d'ajouter pour le titrage, la solution d'anhydride arsénieux, il a été indispensable de neutraliser la trop grande acidité des solutions en présence par le bicarbonate de potassium. Nos résultats, comme les premiers, ont été exprimés en acide periodique réduit, pour une prise d'essai respective de 41 mgrs 60 et de 62 mgrs 40 d'acide β -hydroxybutyrique (Tableau XIII). Ils sont donc nettement supérieurs à ceux que nous ayons obtenus en mettant les Erlenmeyers 8 h. au bain-marie bouillant.

Nous obtenons une consommation d'environ 0,6 atome d'oxygène par molécule d'acide β -hydroxybutyrique.

Ces résultats demeurent donc très faibles.

Recherche de l'aldéhyde ou de la cétone formée au cours de la réaction. — Nous avons recherché si cette oxydation libérait de l'aldéhyde ou une cétone dosables par leur action à froid sur le réactif de NESSLER selon la technique indiquée par LANGE [37].

TABLEAU XIII

*Action de l'acide periodique sur l'acide β -hydroxybutyrique
en ampoules scellées.*

Milligrammes d'acide β -hydroxybutyrique mis en œuvre		41,60	62,40
Centimètres cubes d'acide periodique N/10 réduits	Chauffe : 2 jours	5,25	6,85
	Chauffe : 3 jours	4,40	6,85
		5,35	8,05
		4,30	7,30
	Moyenne	4,85	7,40

Lorsque nous avons ajouté du réactif de NESSLER à nos premiers essais résultant de l'action de l'acide periodique sur l'acide β -hydroxybutyrique (Tableaux XI et XII), nous n'avons obtenu qu'un très léger louche qui s'est précisé au fur et à mesure que l'oxydation par l'acide periodique augmentait elle-même ; mais nous avons pu effectuer quelques dosages sur les solutions chauffées en ampoules scellées (Tableau XIV).

TABLEAU XIV

*Dosage par le réactif de Nessler des corps aldéhydiques ou cétoniques
formés au cours de l'attaque de l'acide β -hydroxybutyrique par
l'acide periodique.*

Milligrammes d'acide β -hydroxybutyrique mis en œuvre	1 ^{er} essai	2 ^e essai	3 ^e essai	4 ^e essai
41,60	0,30 ⁽¹⁾	0,85	1,00	0,10
62,40	0,85	0,65	1,30	0,35

⁽¹⁾ Les chiffres représentent le nombre de cm³ d'iode N/10 utilisés pour réoxyder le mercure réduit.

Il y a donc bien formation, au cours de la réaction, de corps à fonction aldéhydique ou cétonique qui se combinent au réactif de NESSLER; mais le dosage de ces corps par iodométrie ne semble pas devoir donner des résultats définis : devant ces chiffres si irréguliers, on peut craindre que l'acide β -hydroxybutyrique en excès, resté inaltéré après chauffage avec l'acide periodique, ne réagisse lentement à froid sur le réactif de NESSLER ainsi que nous l'indiquons au chapitre IV.

Conclusions du chapitre III. — L'acide β -hydroxybutyrique est attaqué avec beaucoup de difficultés par l'acide periodique. Cette attaque très irrégulière n'est observable qu'après un chauffage prolongé en milieu fortement acide et nécessitant des conditions difficiles à réaliser en pratique. Elle ne paraît pas susceptible de permettre de l'utiliser pour doser l'acide β -hydroxybutyrique. Mais, par opposition avec la facilité si remarquable de l'attaque nitrochromique sur le même acide, elle fournit un bon exemple de la sélectivité de l'action de l'acide periodique.

CHAPITRE IV

ACTION DE L'IODOMERCURATE ALCALIN SUR L'ACIDE β -HYDROXYBUTYRIQUE

Introduction. — Comme nous l'avons signalé précédemment (page 10), P. FLEURY et AWAD [21] ont observé qu'à chaud l'acide β -hydroxybutyrique donnait avec le réactif de NESSLER un précipité d'apparence analogue à celui donné à froid par l'acétone. Nous avons pu constater, ce que nous verrons plus loin, qu'il s'agissait bien d'une combinaison acétonique. C'est ainsi que nous avons été amenés à étudier cette réaction.

Quelques essais nous ont montré que le réactif de NESSLER ne réagissait pas à froid sur l'acide β -hydroxybutyrique, mais à chaud en fournissant alors un précipité jaune orange et du mercure réduit. Ces deux précipités pouvant fixer de l'iode, nous les avons séparés en utilisant la technique de P. FLEURY et AWAD [21] : le complexe acétone-sels de mercure est soluble dans les acides dilués, surtout en présence d'un peu d'iodure de potassium, et le mercure réduit reste insoluble.

Protocole opératoire. — Nos premiers essais ont donc été réalisés selon le protocole suivant :

Solution à doser d'acide β -hydroxybutyrique libre ou sous forme de sels de Ba et Na : 10 cm³.

Solution mercurielle : 7,5 cm³ (1).

Lessive de soude officinale additionnée de 2 volumes d'eau (soit à 10 grs environ de soude base pour 100 grs de solution) : 10 cm³.

(1) Bichlorure de mercure : 13 grs 55 ; iodure de potassium : 36 grs ; eau distillée : q. s. p. 500 cm³. — Broyer le bichlorure au mortier, ajouter l'iode et triturer. Ajouter de l'eau distillée ; décanter après dissolution ; compléter à 500 cm³ et conserver en flacon bien bouché.

Après une certaine durée de chauffage, le précipité est séparé par centrifugation, le liquide surnageant est décanté et le précipité lavé avec quelques centimètres cubes de solution de chlorure de sodium à 5 p. 100. Nous le suspendons alors dans 5 cm³ d'acide chlorhydrique 5 N et 2 cm³ de solution d'iodure de potassium à 20 p. 100. Le complexe acétone-sels de mercure passe en solution ; le mercure réduit, insoluble, est retenu sur un petit filtre en papier de 2 à 3 centimètres de diamètre et le filtre est lavé trois fois de suite avec 2 cm³ d'eau distillée. Nous titrons alors l'acétone du filtrat par iodométrie selon la technique classique de MESSINGER-DENIGÈS [16].

Nous dosons indépendamment le mercure réduit : pour cela le filtre est étalé sur la paroi de l'entonnoir et le précipité chassé dans un Erlenmeyer à l'aide d'un jet de pissette. Nous ajoutons 30 cm³ d'acide chlorhydrique 5 N et 5 cm³ d'iode N/10. Après dix minutes de contact et agitations fréquentes nous titrons l'excès d'iode par de l'hypo-sulfite de sodium en présence d'empois d'amidon.

Nous avons fait une première série d'essais avec 1 cm³ de solution de β -hydroxybutyrate de baryum M/5 en acide β -hydroxybutyrique. Ils ont été effectués, soit à l'étuve à 24°, soit en plongeant dans un bain-marie bouillant le mélange contenu dans un Erlenmeyer de 125 cm³ fermé par un bouchon de liège traversé par un tube de verre effilé à sa partie supérieure. Nous évitons ainsi la concentration du liquide au cours de l'opération car P. FLEURY et MARQUE [25] ont montré que l'action oxydante de l'iodomercurate était fonction de l'alcalinité du milieu. Nous opérons ainsi à volume sensiblement constant et de ce fait à alcalinité constante. Nous avons exprimé ces premiers résultats en milligrammes d'acétone libérés, tablant sur le fait qu'une molécule d'acétone consomme 6 atomes d'iode, comme il ressort de la formule :



Soit n le nombre de centimètres cubes d'hypo-sulfite de sodium N/50 versés, il y a eu $(50-n)$ cm³ d'iode N/50 consommés.

1 cm³ d'iode N/50 correspondant à 0 mgr. 1934 d'acétone, il y a donc dans la prise d'essai $(50-n) \times 0$ mgr. 1934 d'acétone (Tableau XV).

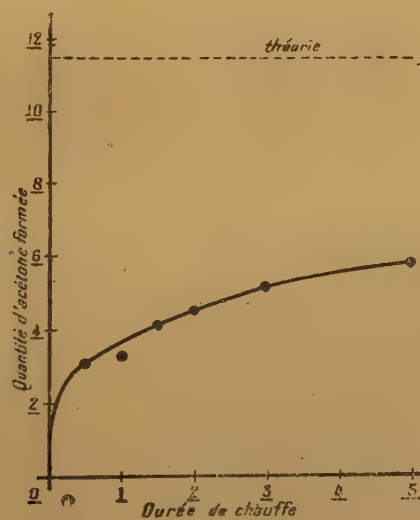
S'il se forme une molécule d'acétone par molécule d'acide β -hydroxybutyrique, notre prise d'essai doit théoriquement donner naissance à 11 mgrs 60 d'acétone (Courbe n° III).

TABLEAU XV

Oxydation de l'acide β -hydroxybutyrique par le réactif de Nessler en fonction de la température et du temps.

	Durée de la réaction	8 jours	15 jours	1 mois
<i>Essais à 24°-25°.</i>	Milligrammes d'acétone libérés (Théorie : 11,6).	2,03	2,86	4,70
	Cm³ d'iode N/50 utilisés pour réoxyder le mercure réduit.	0,70	0,90	0,90

	Durée de la réaction (en heures)	0,50	1	1,50	2	3	5
<i>Essais au bain-marie bouillant</i>	Milligrammes d'acétone libérés (Théorie : 11,6).	3,15	3,32	4,15	4,56	5,22	5,95
	Cm³ d'iode N/50 utilisés pour réoxyder le mercure réduit.	4,10	4,20	6,80	7,20	7,50	6,70



COURBE N° III.

Oxydation de 1 cm³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique M/5 par le réactif de NESSLER en fonction de la durée de chauffe à 100°.

Ces essais nous montrent que l'oxydation en acétone est très lente à 24°. A 100° elle est encore relativement peu rapide et surtout elle se montre incomplète ; après 5 heures il ne s'est guère formé plus de 50 p. 100 de l'acétone prévue si une molécule d'acide β -hydroxybutyrique donne naissance à une molécule d'acétone.

Mais en réduisant de moitié la dose, soit donc en employant 1 cm³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique M/10, les rendements sont meilleurs (Tableau XVI).

TABLEAU XVI

*Oxydation à 100° par le réactif de Nessler de 1 cm³
de solution d'acide β -hydroxybutyrique M/10 en fonction du temps.*

Durée en heures	1	2	3	5
Milligrammes d'acétone précipités en complexe (Théorie : 5,8).....	2,8	3,65	3,94	4,23
Cm ³ d'iode N/50 consommés pour réoxyder le mercure réduit	3,0	5,0	5,0	6,9

Nous avons par ailleurs vérifié que le précipité jaune formé était bien le complexe acétone-sels de mercure : ce dernier, redissous dans l'acide chlorhydrique, a donné par distillation de l'acétone identifiée par les réactions classiques. Nous avons, d'autre part, pratiqué des dosages iodométriques sur des distillats provenant de divers complexes obtenus à partir de quantités identiques d'acide β -hydroxybutyrique : soit 6 cm³ d'une solution M/100. Chacun des complexes, isolé et lavé selon le processus habituel, est dissous dans 5 cm³ d'acide chlorhydrique 5 N et le soluté chlorhydrique est introduit dans un ballon surmonté d'une colonne de VIGREUX puis additionné d'un peu de pierre ponce et de X gouttes d'acide phosphorique pur. Dix minutes de franche ébullition suffisent pour séparer, par distillation, toute l'acétone que l'on recueille dans quelques centimètres cubes d'eau distillée. Ces dosages nous ont permis de retrouver de 89 à 97 p. 100, selon les cas, de la substance dosée iodométriquement comme étant de l'acétone avant distillation (1) (Tableau XVII).

(1) Voir le renvoi page 55.

TABLEAU XVII

*Dosages d'acétone effectués par distillation
à partir du complexe mercuriel.*

Série de quatre essais	1 ^{er}	2 ^e	3 ^e	4 ^e
Milligrammes d'acétone obtenus par distillation à partir de complexe formé à partir de 6 cm ³ d'acide β -hydroxybutyrique M/100 (Théorie : 6 mgrs 24 d'acétone) dosés dans le complexe avant distillation.....	5,72	5,55	6,05	5,87

La formation de l'acétone étant indiscutable, nous avons cherché à améliorer le rendement. Pour ce faire, l'essai avec demi-dose ayant donné de meilleurs résultats, nous avons tout d'abord cherché à modifier la composition du réactif oxydant. Nous avons fait varier successivement l'alcalinité du milieu, le temps de chauffe, puis les proportions de réactif de NESSLER par rapport à la concentration de l'acide β -hydroxybutyrique.

Influence de l'alcalinité du milieu. — MARQUE [46], étudiant l'oxydation du mannitol par le réactif de NESSLER, a observé que la vitesse de réaction augmentait avec la concentration en alcali. La sensibilité varie avec l'origine du corps ; le glucose est oxydé pour une alcalinité à laquelle les polyols ne réduisent pas le réactif de NESSLER.

Nous avons ajouté à 1 cm³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique M/5 : 9 cm³ d'eau, 7,5 cm³ de solution mercurielle et des quantités variables de lessive de soude à 10 p. 100 en poids. Après une heure de chauffage à 100°, nous avons obtenu les résultats exprimés dans le Tableau XVIII.

(¹) Il est nécessaire d'opérer comparativement avec un témoin exempt d'acide β -hydroxybutyrique car, par distillation, il passe toujours une quantité minime de substances réduisant l'hypoiodite, ce qui est vraisemblablement dû à la présence de joints de caoutchouc dans notre appareil distillatoire [BEHRE et BENEDICT (4)].

TABEAU XVIII

Oxydation par le réactif de Nessler de 1 cm³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique M/5 en fonction de l'alcalinité.

Cm ³ de lessive de soude à 10 p. 100 en poids	Cm ³ d'iode N/50 utilisés pour réoxyder le mercure réduit	Milligrammes d'acétone précipités sous forme de complexe mercuriel (Théorie : 11,60)
2,5	3,8	4,64
5,0	5,4	4,48
10,0	6,1	4,19
15,0	5,3	4,25
20,0	5,3	4,30
25,0	6,2	4,04
15 cm ³ de lessive de soude pure	10,3	4,00

Le rendement en acétone est toujours incomplet puisqu'il devrait se former 11 mgrs 60 d'acétone ; il est assez peu influencé par l'alcalinité du milieu. Il aurait plutôt tendance à diminuer légèrement lorsque croît l'alcalinité du milieu ; une partie du complexe est peut-être réduite en mercure métallique car ce dernier augmente faiblement quand le rendement en complexe acétonique diminue.

Influence du temps de chauffe. — Il ressort de nombreux essais que nous avons effectués, que le rendement optimum s'obtient pour une durée de chauffe de 4 heures. En prolongeant la durée de chauffage, le rendement n'est pas amélioré, bien au contraire. Avec 1 cm³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique M/50, il s'est formé 0 mgr. 97 d'acétone précipité à l'état de complexe après 5 heures de chauffe et seulement 0 mgr. 87 après 10 heures. De même, avec 1 cm³ de solution M/20, il s'est formé 2 mgrs 36 d'acétone après 5 heures de chauffe et 2 mgrs 19 après 10 heures. Nous avons alors pensé qu'il y avait peut-être perte d'une partie de l'acétone par volatilisation. Trois faits nous ont confirmés dans cette manière de voir :

A. L'action du réactif de Nessler sur l'acétone. — En cherchant à doser l'acétone par action du réactif de NESSLER à 100° sur une solution d'acétone titrée par iodométrie, nous avons constaté que nous obtenions des chiffres inférieurs à ceux obtenus en faisant le même dosage à la température ordinaire (Tableau XIX).

Nous avons donc pensé à des pertes par volatilisation.

TABLEAU XIX.

Action du réactif de Nessler sur des solutions titrées d'acétone en fonction de la température et du temps de contact.

Durée et température de contact	Milli-grammes d'acétone trouvés	Milli-grammes d'acétone mis en œuvre	Erreur p. 100
20 minutes à 24°	4,313	4,541	— 5
1 heure à 24°	4,303	4,541	— 5,25
2 heures à 24°	4,342	4,541	— 4,40
24 heures à 24°	1,102	1,120	— 1,60
24 heures à 24°	1,141	1,120	+ 1,85
1 heure à 100°	0,542	0,580	— 6,55
1 heure à 100°	1,073	1,160	— 7,50
5 heures à 100°	0,522	0,579	— 9,85
5 heures à 100°	0,986	1,158	— 14,85

B. En caractérisant l'acétone qui se dégage. — Nous avons placé un petit barboteur à boule, contenant quelques gouttes de réactif de NESSLER, sur le bouchon percé qui ferme l'Erlenmeyer où s'effectue la réaction. Il se forme un léger trouble jaunâtre, prouvant ainsi qu'il y a un léger dégagement d'acétone.

C. En opérant en tube scellé. — Nous avons effectué l'oxydation par le réactif de NESSLER en tube scellé en opérant concurremment avec un témoin. Avec 1 cm³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique

M/50 nous avons eu, après 5 heures de chauffe en ampoules scellées, *1 mgr.22* au cours d'une première expérience et *1 mgr.10* au cours d'une seconde alors que la théorie prévoyait *1 mgr. 16*.

Le rendement n'est cependant pas amélioré en portant 4 heures au bain-marie bouillant l'Erlenmeyer surmonté d'un réfrigérant à reflux : celui-ci ne suffit pas pour éviter les petites pertes en acétone.

Nous avons aussi pensé à une perte de l'acétone par volatilisation lors de la filtration de la solution chlorhydrique du complexe, mais nous nous sommes rendus compte qu'il n'en était rien.

Influence de la concentration en réactif oxydant. — Nous avons opéré avec des quantités variables d'acide β -hydroxybutyrique, la concentration en réactif de NESSLER étant identique à celle des opérations précédentes : la variation porte donc sur le rapport

$$\frac{\text{acide } \beta\text{-hydroxybutyrique}}{\text{réactif de NESSLER}}$$

Dans tous ces essais la durée de chauffage a été de 5 heures à 100° (Tableau XX).

TABLEAU XX

Action du réactif de Nessler à 100° sur une solution d'acide β -hydroxybutyrique en fonction de la concentration en réactif oxydant.

Cm ³ d'acide β -hydroxybutyrique M/50 mis en jeu	Cm ³ d'iode N/50 consommés pour réoxyder le mercure réduit	Milligrammes d'acétone		
		Précipités à l'état de complexe	Théoriques	Erreur p. 100 par défaut
1	1,3	0,97	1,16	— 16
2	2,45	1,83	2,32	— 21
3	4,55	2,76	3,48	— 20
4	5,70	3,44	4,64	— 25
5	6,65	4,022	5,80	— 31

Cet essai nous montre indiscutablement qu'il faut un excès considérable de réactif mercuriel par rapport à l'acide β -hydroxybutyrique.

son ester éthylique par l'alcalinité du réactif de NESSLER. Nous avons opéré, comme précédemment, avec les mêmes doses de réactif de NESSLER à 100° et sur 1 cm³ de solution d'acétylacétate de sodium ou d'acide acétylacétique naissant.

TABLEAU XXI

Action du réactif de Nessler sur l'acide acétylacétique.

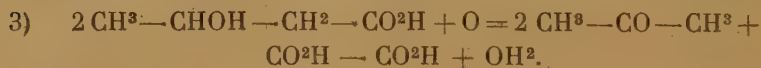
Temps de contact à 100°	Acétylacétate de sodium			Acétylacétate d'éthyle
	30'	1 h.	5 h.	5 h.
Milligrammes d'acétone précipités sous forme de complexe mercuriel (Théorie : 5,80)	4,40	4,50	4,43	4,18
Cm ³ d'iode N/50 consommés pour réoxyder le mercure réduit (1) . . .	3,35	4,50	6,70	7,25

(1) L'alcool formé par saponification de l'acétylacétate d'éthyle réduit également le réactif de NESSLER.

Les résultats du tableau XXI montrent que le complexe acétonique se forme très rapidement et après 30 minutes, 1 heure ou 5 heures de chauffage on obtient à peu près les mêmes quantités de complexe acétonique formé. Les chiffres obtenus après 5 heures seraient même légèrement inférieurs à ceux obtenus après 1 heure ; nous avons fait précédemment la même constatation pour l'acétone et pour l'acide β-hydroxybutyrique.

Si l'oxydation se fait selon les schémas 1 et 2, ce serait la vitesse de la réaction 1 qui réglerait l'ensemble du système.

La quantité de mercure réduit, à peine supérieure à la moitié de la quantité prévue, permet d'envisager un autre schéma de réaction :



MARQUE [46] a montré que l'acide oxalique ne réduisait pas le réactif de NESSLER. Dans ce schéma, 1 cm³ d'iode N/50 permettra de réoxyder le mercure réduit par 1 cm³ de solution d'acide β-hydroxybutyrique M/50.

La quantité insuffisante de mercure réduit formé ne permet pas de considérer que le déficit en complexe acétonique est dû à une oxydation plus complète de la molécule qui, exigeant une plus grande quantité d'oxygène, s'accompagnerait inévitablement de la formation d'une plus grande quantité de mercure réduit.

Nos essais ont donc tendu à améliorer le rendement en utilisant une faible dose d'acide β -hydroxybutyrique oscillant autour de 1 cm³ de solution M/50.

Solubilité du complexe. — Le complexe acétone-sels de mercure n'est pas totalement insoluble et au cours de la centrifugation puis des lavages, nous éliminons une petite quantité d'acétone non précipitée ainsi qu'il ressort des expériences suivantes :

1° Dans l'eau distillée il se dissout une quantité de complexe correspondant à environ 0 mgr. 90 d'acétone par litre. Pour effectuer cette détermination, nous avons agité deux fois de suite le précipité de complexe durant 2 h. 30 avec 500 cm³ d'eau et, après filtration, on fait sur cette solution un dosage iodométrique de l'acétone selon notre protocole habituel.

2° Nous traitons de façon différente trois complexes identiques obtenus par action du réactif de NESSLER sur une même quantité d'acétone. Le premier, isolé par centrifugation et lavé comme de coutume avec quelques centimètres cubes de solution de chlorure de sodium à 5 p. 100, nous donne une quantité de complexe renfermant 1 mgr. 083 d'acétone.

Dans le second essai nous ne séparons pas le complexe, nous acidifions le contenu de l'Erlenmeyer par 5 cm³ d'acide chlorhydrique 5 N : le complexe acétonique se dissout par agitation et, après filtration et dosage iodométrique, nous trouvons 1 mgr. 122 d'acétone.

Dans le troisième essai nous isolons le complexe par centrifugation, et le lavons 5 à 6 fois par 60 cm³ d'eau avant de le reprendre par l'acide chlorhydrique et de le doser à l'iode. Il correspond à 0 mgr. 986 d'acétone.

La quantité d'acétone mise en œuvre dans nos trois essais était de 1 mgr. 160.

Ces essais nous montrent qu'une faible quantité d'acétone reste dans le liquide surnageant et que des lavages prolongés du complexe avec de l'eau le dissocient.

3° Dosage de l'acétone dans les liquides de décantation. Nous faisons deux séries d'essais et pour chacun de ces essais nous dosons d'une part l'acétone du complexe précipité et d'autre part l'acétone que peuvent renfermer le réactif de NESSLER et le liquide de lavage séparés par centrifugation et décantation (tableau XXII). En additionnant les deux résultats, il y a une nette amélioration du rendement, mais il y a encore un léger déficit.

TABLEAU XXII

*Dosage de l'acétone dans des complexes mercuriels
et dans la liqueur surnageante.*

	Centimètres cubes de solution d'acide β -hydroxybutyrique M/5 mis en œuvre					
	0 cm ³ 50 = 10 mgrs 40 d'acide		1 cm ³ = 20 mgrs 80 d'acide		1 cm ³ 50 = 31 mgrs 20 d'acide	
	Complexe	Liquide surna- geant	Complexe	Liquide surna- geant	Complexe	Liquide surna- geant
1 ^{re} série	9,360	0,520 ⁽¹⁾	19,24	0,35	27,74	0,35
	Total : 9,880		Total : 19,59		Total : 28,09	
2 ^e série	10,23	0,17	20,28	0,17	30,70	0,80
	Total : 10,40		Total : 20,45		Total : 31,50	

(1) Chiffres exprimés en milligrammes d'acétone.

4° Enfin, en titrant directement l'acétone par acidification (sans séparation préalable du complexe), du mélange réactionnel (en opérant à partir d'une solution d'acétone, d'acide acétylacétique ou d'acide β -hydroxybutyrique) puis filtration pour séparer le mercure réduit on obtient des chiffres un peu supérieurs à ceux obtenus en centrifugeant préalablement (Tableau XXIII).

Il est à noter que lorsque l'on opère sur une solution d'acétone il n'y a pas de mercure réduit.

TABLEAU XXIII

Dosage de l'acétone du complexe obtenu par action du réactif de Nessler sur des solutions d'acétone, d'acide acétylacétique ou d'acide β -hydroxybutyrique, sans séparation du complexe ou après séparation par centrifugation.

Temps de chauffe : 5 heures au bain-marie bouillant	Sans centri- fugation	Après centri- fugation	Théorie
0 cm ³ 50 de solution d'acétone à 1 gr. 16 p. 1000	—	0,52 ⁽¹⁾	0,58
1 cm ³ de solution d'acétone à 1 gr. 16 p. 1000	—	0,99	1,16
1 cm ³ 50 de solution d'acétone à 1 gr. 16 p. 1000	1,76	1,55	1,74
2 cm ³ de solution d'acétone à 1 gr. 16 p. 1000	2,25	2,10	2,32
0 cm ³ 50 de solution d'acide acétylacé- tique M/10	3,40	2,49	2,90
1 cm ³ de solution d'acide acétylacé- tique M/10	7,62	4,99	5,80
1 cm ³ 50 de solution d'acide acétylacé- tique M/10	8,70	6,56	8,70
2 cm ³ de solution d'acide acétylacé- tique M/10	7,72	9,11	11,60
0 cm ³ 50 de solution d'acide β -hydro- xybutyrique M/50	0,75 ⁽²⁾	0,55	0,58
1 cm ³ de solution d'acide β -hydroxy- butyrique M/50	1,72	1,09	1,16
1 cm ³ 50 de solution d'acide β -hydro- xybutyrique M/50	2,07	1,71	1,74
2 cm ³ de solution d'acide β -hydroxy- butyrique M/50	2,26	1,93	2,32

⁽¹⁾ Les chiffres indiquent le nombre de milligrammes d'acétone retrouvés.

⁽²⁾ Ces chiffres sont trop élevés et cependant nous avons éliminé le mercure réduit par filtration.

En nous basant sur les résultats de ces deux essais nous avons cherché à modifier les conditions opératoires pour améliorer les résultats de nos dosages.

Nous avons tout d'abord fait des essais sur des petites doses d'acide β -hydroxybutyrique qui accusent une légère erreur par excès (tableau XXIV).

TABLEAU XXIV

*Action du réactif de Nessler
sur de très petites quantités d'acide β -hydroxybutyrique.*

Quantité mise en œuvre..	2,08 ⁽¹⁾	1,04	0,52	0,26
Quantité retrouvée	1,95	0,97	0,555	0,31

(¹) Les chiffres expriment le nombre de milligrammes d'acide β -hydroxybutyrique en admettant qu'une molécule d'acide β -hydroxybutyrique donne naissance à une molécule d'acétone.

Action du réactif de Nessler sur l'acide β -hydroxybutyrique en vapeur fluente. — Le mode de chauffage de nos Erlenmeyers au bain-marie bouillant n'est pas parfait car il est à craindre que la chauffe ne soit pas uniforme. Pour pallier à cet inconvénient nous avons songé à effectuer la chauffe à l'autoclave en vapeur fluente.

A cet effet, nous avons disposé, dans le panier de l'autoclave, nos fioles munies comme à l'habitude de bouchons à tubes effilés et, après avoir assujéti le couvercle, nous avons chauffé en réglant la flamme de manière à ce que la vapeur sorte doucement par le robinet supérieur.

Après 4 heures de ce chauffage et par comparaison avec des mélanges identiques maintenus le même temps au bain-marie bouillant nous avons constaté que le chauffage à l'autoclave donnait des chiffres sensiblement identiques à ceux obtenus en opérant au bain-marie bouillant (Tableau XXV).

TABLEAU XXV

Action du réactif de Nessler sur l'acide β -hydroxybutyrique en utilisant soit la chaleur du bain-marie bouillant, soit celle de l'autoclave.

Milligrammes d'acide β -hydroxybutyrique mis en œuvre	1,04	2,08	3,12	4,16
Chauffage à l'autoclave ...	0,95 ⁽¹⁾	1,91	2,93	3,95
Chauffage au bain-marie à 100°.....	0,97	1,95	2,91	3,86

⁽¹⁾ Les chiffres expriment le nombre de milligrammes d'acide β -hydroxybutyrique dosés en admettant qu'une molécule d'acide β -hydroxybutyrique fournit une molécule d'acétone.

Technique proposée pour le dosage de l'acide β -hydroxybutyrique en solutions pures. — A la suite de nos essais, nous proposons la technique suivante de dosage de l'acide β -hydroxybutyrique en solutions pures :

Pour une prise d'essai allant de 1 à 10 cm³ de solution et renfermant de 0,5 à 4 milligrammes d'acide β -hydroxybutyrique, nous mesurons dans un Erlenmeyer 7 cm³ 50 de solution mercurielle et 10 cm³ de lessive de soude à 10 p. 100 en poids. Nous faisons parallèlement un témoin, et les deux fioles, fermées d'un bouchon traversé par un tube effilé, sont plongées durant 4 heures dans un bain-marie bouillant.

Au bout de ce temps, et après refroidissement, le complexe formé est séparé par centrifugation et lavé avec 5 cm³ d'une solution de chlorure de sodium à 5 p. 100. Le dit complexe est alors trituré à l'aide d'un agitateur avec 5 cm³ d'acide chlorhydrique 5 N et 2 cm³ de solution d'iodure de potassium à 20 p. 100. La solution chlorhydrique est alors jetée sur un petit filtre de 2 à 3 cm. de diamètre pour séparer le mercure réduit. Ce précipité est lavé par deux ou trois fois avec chaque fois 2 cm³ d'eau distillée. On verse alors dans le filtrat joint aux eaux de lavage 5 cm³ d'iode N/10 puis 4 cm³ de lessive de soude à 30 p. 100 en poids (lessive de soude du commerce).

Après dix minutes de contact on acidifie par 10 cm³ d'acide chlo-

hydrique 5 N et titre l'iode mis en liberté par de l'hyposulfite de sodium N/50 en présence d'un peu d'empois d'amidon.

Si nous désignons par n le nombre de centimètres cubes de solution d'hyposulfite de sodium utilisés pour la solution d'acide β -hydroxybutyrique et par n' ceux utilisés pour le témoin et si nous posons : $n' - n = N$, la quantité d'iode N/10 consommée est de $\left(5 - \frac{N}{5}\right) \text{ cm}^3$.

1 cm^3 d'iode N/10 correspond à 0,1934 milligramme d'acétone, et de ce fait à $\frac{10,4}{6} = 1,7333$ milligramme d'acide β -hydroxybutyrique.

Le nombre de milligrammes d'acide β -hydroxybutyrique dans la prise d'essai sera égal à :

$$\left(5 - \frac{N}{5}\right) \times 1,7333.$$

Nous avons utilisé cette technique pour doser des solutions d'acide β -hydroxybutyrique à titre inconnu et nous avons rassemblé dans le tableau XXVI les résultats obtenus ⁽¹⁾.

Ils sont satisfaisants dans l'ensemble et montrent qu'à l'aide du réactif de NESSLER on peut titrer l'acide β -hydroxybutyrique avec une bonne approximation.

TABLEAU XXVI

Dosage de solutions pures d'acide β -hydroxybutyrique par notre technique au réactif de Nessler.

Numéro des solutions	1	2	3	4	5	6	7	8
Milligrammes d'acide β -hydroxybutyr. trouvés	0,48	1,013	1,245	1,493	1,60	1,94	2,364	3,20
Milligrammes d'acide β -hydroxybutyr. ajoutés.	0,52	1,04	1,04	1,56	1,56	2,08	2,60	3,12
Erreur p. 100.....	—8,30	—2,65	+16,45	—4,50	+2,50	—7,25	—10	+2,50

(1) Solutions préparées par M. COURTOIS en diluant de façon convenable une solution titrée d'acide β -hydroxybutyrique.

Conclusions du chapitre IV. — L'acide β -hydroxybutyrique est oxydé à 100° par l'iodomercurate de potassium en donnant une molécule d'acétone par molécule d'acide oxydé.

L'acétone précipite sous forme de complexe mercuriel qui est séparé par centrifugation puis redissous dans un acide ; l'acétone libérée est alors dosée par iodométrie.

Nous avons étudié les modalités de cette oxydation ; nous avons ainsi mis au point une technique nouvelle de dosage de l'acide β -hydroxybutyrique en solutions pures, technique qui fournit des résultats un peu moins précis que celle basée sur l'emploi de la solution nitrochromique mais est plus sélective car on dose l'acétone formée.

Sur des solutions pures la technique à l'iodomercurate est la plus précise des méthodes relativement sélectives actuellement connues.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES EN VUE D'APPLIQUER
A L'URINE LE DOSAGE DE L'ACIDE
 β -HYDROXYBUTYRIQUE PAR LE RÉACTIF
DE NESSLER

CHAPITRE I

DOSAGE DE L'ACIDE β -HYDROXYBUTYRIQUE EN SOLUTIONS PURES ADDITIONNÉES DE SUBSTANCES POUVANT SE RENCONTRER DANS L'URINE

Introduction. — La technique que nous avons proposée pour doser l'acide β -hydroxybutyrique en solutions pures par action du réactif de NESSLER, fournit des résultats plus précis que les techniques basées sur l'oxydation chromique en acétone qui donnent des chiffres entachés d'une erreur par défaut d'au moins 20 p. 100. Sur des solutions pures la technique au réactif de NESSLER est un peu moins régulière et précise que la technique basée sur la réduction de solutions nitrochromiques mais nous avons signalé que cette dernière technique était trop peu spécifique pour se prêter à des applications biologiques.

Nous avons donc cherché à doser l'acide β -hydroxybutyrique dans l'urine à l'aide du réactif de NESSLER. Nos essais ont débuté par des recherches préliminaires où nous avons étudié l'influence de composés normaux et pathologiques de l'urine sur le dosage de l'acide β -hydroxybutyrique par le réactif de NESSLER.

Pour certains de ces constituants nous avons comparé leur action sur le dosage de l'acide β -hydroxybutyrique par notre technique et par celle de VAN SLYKE (1). Nous avons constaté que dans la plupart des cas la nôtre était plus spécifique.

Les principaux corps qui peuvent être associés à l'acide β -hydroxybutyrique dans l'urine sont les corps cétoniques. Nous avons donc tout d'abord cherché à doser des mélanges d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique, puis ensuite d'acide acétylacétique et d'acide β -hydroxybutyrique.

(1) Pour la technique de Van SLYKE, se reporter aux « Fiches techniques de Chimie biologique » de M. le Professeur FLEURY (19).

Dosage de mélanges d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique. — Voici le principe de nos essais : Par addition de réactif de NESSLER au mélange des deux corps, l'acétone est précipitée presque immédiatement. La solution filtrée est alors portée à 100° et l'acide β -hydroxybutyrique donne à son tour la combinaison acétonique. Nous avons tout d'abord recherché si la précipitation de l'acétone n'induisait pas celle de l'acide β -hydroxybutyrique.

1° **Influence du temps de contact.** — Nous mélangeons 1 cm³ de solution d'acétone à 1 gr. 20 pour 1000, 1 cm³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique à 2 grs 08 p. 1.000, 8 cm³ d'eau, 7 cm³ 5 de solution mercurielle et 10 cm³ de lessive de soude à 10 p. 100 en poids.

Nous centrifugeons après un temps de contact variable et portons le liquide décanté 4 heures à 100°. L'acétone des deux précipités mercuriels, celui obtenu à froid et celui obtenu à chaud, est dosée comme de coutume (Tableau XXVII).

TABLEAU XXVII

Dosage d'un mélange d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique par le réactif de Nessler en fonction du temps de contact.

Durée de contact (en minutes)	1	5	15	30
Milligrammes d'acétone précipités à froid (Théorie : 1,21) ..	1,19	1,22	1,20	1,24
Milligrammes d'acide β -hydroxybutyrique précipités à chaud (Théorie : 2,08) ⁽¹⁾	2,11	2,11	2,13	2,06

⁽¹⁾ Nous admettons qu'une molécule d'acide β -hydroxybutyrique fournit une molécule d'acétone : de ce fait la consommation de 1 cm³ d'iode N/10 correspond à 1 mgr. 7333 d'acide β -hydroxybutyrique.

Nous pouvons donc séparer aisément l'acétone par précipitation à froid et doser ce corps en présence d'acide β -hydroxybutyrique et réciproquement. Toutefois, après quinze minutes, il y a un peu d'acide β -hydroxybutyrique attaqué, ce qui se manifeste par un accroissement de la quantité d'acétone précipitée à froid corrélative à une diminution de l'acide β -hydroxybutyrique.

Nous pensons que le temps de contact optimum pour la précipitation de l'acétone à l'état de complexe est de 5 *minutes* et c'est cette durée que nous emploierons lorsqu'il s'agira, dans une urine, de doser l'acide β -hydroxybutyrique en présence d'acétone.

• 2° **Influence des proportions de réactifs.** — Nous avons voulu nous rendre compte de la sensibilité de la réaction en faisant varier les quantités de chacune des deux solutions, acétonique et β -hydroxybutyrique, mises en œuvre. Nous avons obtenu des résultats satisfaisants dans l'ensemble (Tableau XXVIII) en dosant l'acétone après un temps de contact de 5 minutes. Il semblerait même que l'attaque de l'acide β -hydroxybutyrique par le réactif de NESSLER se révèle plus complète lorsqu'elle a lieu en présence de traces d'acétone. Pour 17 cm³ 5 de réactif mis en œuvre, il ne faut toutefois pas opérer sur moins de 1 mgr. d'acide β -hydroxybutyrique — nous avons vu précédemment pourquoi —, ni sur plus de 3 à 4 mgrs d'acétone.

TABLEAU XXVIII

Action du réactif de Nessler sur des mélanges d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique en fonction de la quantité de chacun de ces corps respectifs.

Milligrammes d'acétone mis en œuvre	Milligrammes d'acide β -hydroxy- butyrique mis en œuvre	Milligrammes d'acétone retrouvés	Milligrammes d'acide β -hydroxy- butyrique retrouvés
1,209	2,08	1,208	2,115
2,418	2,08	2,40	2,115
3,627	2,08	3,57	2,097
1,209	4,16	1,208	4,10
3,627	1,04	3,558	1,109

Action du réactif de Nessler sur l'acide acétylacétique. — Ayant montré que dans notre technique nous pouvions nous débarrasser de l'acétone, nous avons étudié l'influence de l'acide acétylacétique. Nous avons donc recherché :

a) si cet acide précipitait à froid par le réactif de NESSLER,

b) si, dans un mélange des trois corps cétoniques, l'acide acétylacétique précipitait à froid par le réactif de NESSLER en même temps que l'acétone, ou si, au contraire, la totalité ou une partie n'était précipitable qu'à chaud en même temps que l'acide β -hydroxybutyrique.

Pour ces déterminations nous avons utilisé la solution d'acide acétylacétique libre préparée selon le processus indiqué note 1 au bas de la page 40.

Il ressort de nos premiers essais qu'une partie de l'acide acétylacétique précipite à froid par le réactif de NESSLER durant les 5 minutes de contact et que l'autre partie précipite à chaud. Le pourcentage respectif de chacune de ces deux précipitations en fonction du temps de contact est exprimé dans le tableau XXIX en milligrammes d'acétone. Il montre qu'en prolongeant le temps de contact la proportion d'acide acétylacétique précipité à froid va en croissant.

TABLEAU XXIX

*Pourcentage d'acide acétylacétique précipité à froid
par le réactif de Nessler en fonction du temps de contact.*

	Milligrammes d'acétone précipités à froid	Milligrammes d'acétone précipités ensuite à chaud	Quantité précipitée à froid et à chaud	Pourcentage de l'acétone précipitée à froid
1 h. au bain-marie bouillant			5,17	
5' à froid et 4 h. au bain-marie bouillant.	4,07	1,04	5,12	79,60
10' à froid et 4 h. au bain-marie bouillant.	4,41	0,76	5,17	85,25
30' à froid et 4 h. au bain-marie bouillant.	4,73	0,41	5,14	92,10

Nous avons enfin fait une série d'essais complets sur l'action à chaud et à froid du réactif de NESSLER sur l'acide acétylacétique en

présence d'acétone ou d'acide β -hydroxybutyrique, ou de ces deux corps réunis. Nous en avons conclu que, pour l'acide acétylacétique, selon que l'on opère en présence de ce seul acide, ou en présence de cet acide, d'acétone ou d'acide β -hydroxybutyrique ou de ces deux corps réunis, les pourcentages de précipitation à froid, après un contact de 5 minutes, s'établissent comme suit :

Acide acétylacétique seul	80 à 82 p. 100
Acide acétylacétique + acétone.....	88 p. 100
Acide acétylacétique + acétone + acide β -hydroxybutyrique	90 p. 100

La précipitation à froid de l'acide acétylacétique par le réactif de NESSLER est donc accélérée en présence d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique et nous pouvons admettre que dans un mélange de ces deux corps, 80 à 90 p. 100 de l'acide acétylacétique se trouvent précipités après 5 minutes de contact à la température ordinaire. Nous ne pouvons songer à prolonger le temps de contact sans risquer de décomposer une partie de l'acide β -hydroxybutyrique.

Action du réactif de Nessler sur quelques acides existant dans l'urine normale. — Nous avons étudié un acide cétonique : l'acide pyruvique ($\text{CH}^3 - \text{CO} - \text{COH}^2$) et deux autres acides-alcools : l'acide lactique ($\text{CH}^3 - \text{CHOH} - \text{CO}^2\text{H}$) et l'acide citrique ($\text{CO}^2\text{H} - \text{CH}^2 - \text{CO} - \text{H} - \text{CH}^2 - \text{CO}^2\text{H}$) qui sont tous trois des



constituants normaux de l'urine.

Les acides lactique et pyruvique prennent naissance dans les muscles à partir du glucose. On les retrouve dans le sang et dans l'urine normale et pathologique, surtout après de grandes fatigues : l'acide lactique, après un travail musculaire violent, peut atteindre dans l'urine une concentration de 1 gr. 37 par litre [TERROINE et TRIMBACH (55)].

1° Acide pyruvique. — L'urine normale en renferme environ 300 milligrammes par litre mais ce taux augmente dans l'avitaminose B¹.

Opérant sur une prise d'essai de 2 mgrs 70 nous avons obtenu après 4 heures de chauffe à 100° avec du réactif de NESSLER un complexe mercuriel correspondant à 0 mgr. 116 d'acétone et du mercure réduit nécessitant pour être oxydé 0 cm³ 18 d'iode N/10.

Le complexe mercuriel précipité, repris par un acide, n'a pas fourni par distillation de substance réduisant l'hypoiodite, ce n'est donc pas un complexe acétone-sels de mercure.

Par le VAN SLYKE nous avons eu un précipité correspondant à 1 gr. 78 d'acide β -hydroxybutyrique par litre contre 26 mgrs avec la technique à l'iodomercurate.

2. **Acide lactique.** — Nous avons obtenu 0 mgr. 03 de complexe mercuriel exprimé en acétone, et 0 cm³ 40 d'iode N/10 a été nécessaire pour réoxyder le mercure réduit pour une prise d'essai de 2 mgrs 70. Par contre il n'y a eu aucun précipité avec le Van SLYKE.

3° **Acide citrique.** — L'urine peut en renfermer jusqu'à 0 gr. 72 par litre, mais le taux d'élimination normal oscillerait entre 0 gr. 25 et 0 gr. 68 par jour.

Si, par la technique de VAN SLYKE, nous avons obtenu un précipité correspondant à 7 grs 67 d'acide β -hydroxybutyrique par litre, nos 2 mgrs 20 d'acide citrique n'ont par contre provoqué, par notre technique à l'iodomercurate alcalin, aucune formation de complexe se comportant comme celui de l'acétone, ce qui confirme les observations de MARQUE [46].

En conclusion, nous voyons que lorsque nous dosons dans l'urine, par le procédé classique de VAN SLYKE ou par le nôtre, l'acide β -hydroxybutyrique, nous dosons en même temps d'autres acides qui viennent de ce fait fausser nos dosages (1). Cette remarque s'applique plus particulièrement à la technique de VAN SLYKE.

(1) MORE (48) signale que l'allantoïne de l'urine réduit le réactif de NESSLER à la température ordinaire.

CHAPITRE II

ACTION DU RÉACTIF DE NESSLER SUR DES URINES ADDITIONNÉES DE QUANTITÉS CONNUES D'ACÉTONE ET D'ACIDE β -HYDROXYBUTYRIQUE

Considérations générales. — Nous avons vu qu'il était possible de doser par la méthode que nous préconisons l'acide β -hydroxybutyrique en solutions pures, même en présence d'acétone et d'acide acétylacétique et que l'on pouvait doser éventuellement l'acétone par la même occasion.

Nous avons pensé à appliquer cette méthode de dosage à l'urine susceptible de contenir un ou deux de ces corps ; des essais d'orientation ont montré que l'urine normale renferme des constituants qui précipitent ou réduisent à froid comme à chaud le réactif de NESSLER. Au nombre de ceux-ci on peut ranger les acides lactique et pyruvique et des sucres urinaux normaux sans parler de l'acétone qui se trouverait éliminée à la dose de 0 gr. 02 à 0 gr. 03 par jour dans toute urine normale [HUBBARD et NOBACK (34)].

Nos recherches ont porté sur une urine normale, puis sur une urine additionnée tantôt d'acétone, tantôt d'acide β -hydroxybutyrique, tantôt de ces deux corps en quantité connue.

Action directe du réactif de Nessler sur une urine additionnée ou non d'acétone. — Lors de nos premiers essais nous avons opéré directement sur l'urine comme si nous avions à faire à des mélanges d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique en solutions pures. Nous avons essayé de doser iodométriquement le précipité obtenu après un contact de 10 minutes à la température ordinaire par action du réactif de NESSLER sur l'urine, et celui résultant de 4 heures de

chauffe à 100° après élimination du premier précipité. Le complexe mercuriel et le mercure réduit, provenant du précipité formé à la température ordinaire, ont pu être exprimés en centimètres cubes d'iode N/10, mais cela n'a pas été possible pour le précipité obtenu à 100°.

Nous n'avons pas eu d'amélioration en portant à 1 heure le temps de précipitation à la température ordinaire qui aurait dû nous permettre d'éliminer une plus grande quantité de substances qui gênent notre dosage à 100°.

Pour avoir des résultats plus corrects il nous a fallu :

1° Pour une même prise d'urine, augmenter la quantité de réactif de NESSLER mise en œuvre : au moins 50 cm³ de réactif pour 8 cm³ d'urine. Le complexe mercuriel obtenu à 100° est alors accompagné d'une grande quantité de mercure réduit.

2° Reprendre le précipité obtenu à 100° par de l'acide sulfurique à 20 p. 100 volume, au lieu d'acide chlorhydrique 5 N, et un peu d'iode de potassium.

3° Après addition d'iode à la solution sulfurique du complexe acétonique et formation d'un abondant précipité jaune-orange par alcalinisation, redissoudre ce dernier, après un contact de 10 minutes, par de l'acide chlorhydrique au 1/2 en quantité suffisante : on peut alors saisir le virage.

Voici les résultats que nous avons obtenus en opérant sur une urine normale puis sur la même urine additionnée d'acétone (Tableau XXX).

TABLEAU XXX

*Action directe du réactif de Nessler
sur une urine additionnée ou non d'acétone.*

		Urine normale		Urine + Acétone	
		Complexe	Mercure réduit	Complexe	Mercure réduit
Cm ³ d'iode N/10 utilisés	à 22°	2,23 ⁽¹⁾	2,33	3,16 ⁽¹⁾	2,37
	à 100°	1,98	17,08	1,54	14,48

(¹) Si l'on exprime en milligrammes d'acétone la différence d'iode N/10 entre les deux complexes obtenus à 22° après 1 heure de contact, on trouve 0 mgr. 9 d'acétone au lieu de 1 mgr. 21 que nous avions ajouté à l'urine.

Les résultats obtenus sont fort inconstants et une nécessité s'est imposée : la défécation préalable pour priver l'urine de la plus grande partie des substances qui précipitent par le réactif de NESSLER et qui gênent nos dosages.

Essais sur l'urine déféquée par le cuivre et la baryte. —

SALKOWSKI a montré que par addition d'un sel cuivrique et d'une base alcalino-terreuse à une solution sucrée le précipité formé retenait le sucre. VAN SLYKE a éliminé de cette manière le glucose pouvant exister dans les urines où il voulait doser l'acide β -hydroxybutyrique. VAN SLYKE recommande cette défécation par le sulfate cuivrique et un lait de chaux même si l'urine ne renferme pas de glucose : elle élimine ainsi des substances oxydées par le mélange sulfochromique en corps susceptibles de précipiter avec SO^4Hg (1). Il s'agit vraisemblablement des glucides urinaires normaux [AMBERT (1), BIGET (5)] qui, perturbant le dosage de l'acide β -hydroxybutyrique, sont ainsi éliminés.

P. FLEURY et AMBERT [20], AMBERT [1] ont fait une étude détaillée de l'entraînement des glucides par l'hydroxyde de cuivre en milieu alcalin et ont montré qu'en utilisant la baryte on pouvait avoir un entraînement pratiquement total.

En nous basant sur les recherches de ces auteurs nous avons opéré ainsi :

Technique. — Dans une fiole jaugée de 50 cm³, mesurer 25 cm³ d'urine et 5 cm³ d'une solution de sulfate de cuivre à 10 p. 100. Après mélange, ajouter en plusieurs fois et en agitant à chaque fois de l'eau de baryte (saturée à la température du laboratoire) en quantité suffisante pour compléter le volume à 50 cm³. Après avoir bien agité, nous laissons un quart d'heure en contact et filtrons : le filtrat doit être sensiblement incolore.

Nous prélevons 40 cm³ de ce filtrat, les neutralisons par de l'acide sulfurique N à la touche au tournesol, les amenons à 50 cm³ avec de l'eau distillée et filtrons. C'est sur 10 cm³ de ce filtrat que nous avons effectué nos essais habituels en ajoutant 17 cm³ 5 de réactif de Ness-

(1) Cependant FRICKE (28) a reproché à la défécation cupro-calcaïque de ne pas éliminer de l'urine des substances qui peuvent se combiner au réactif mercurique, en particulier des aldéhydes. Ces derniers seraient relativement abondants dans certaines urines diabétiques.

LER et en laissant une demi-heure en contact à la température ordinaire. Ces 10 cm³ de filtrat correspondent à 4 cm³ d'urine.

Il résulte de ces essais (Tableau XXXI) :

1° que l'urine normale, déféquée, contient des substances qui à la température ordinaire précipitent par le réactif de NESSLER et libérées de ce précipité, réduisent l'hypoiodite ;

2° que l'acétone et l'acide β -hydroxybutyrique, ajoutés à l'urine, se retrouvent pour la plus grande partie ; mais si l'on ajoute à la fois l'acétone et l'acide β -hydroxybutyrique, on retrouve bien l'acétone mais une partie de l'acide β -hydroxybutyrique ne l'est pas. Dans les deux cas l'acétone a été précipitée d'une façon satisfaisante à la température ordinaire :

TABLEAU XXXI

Action du réactif de Nessler sur une urine normale et sur une urine additionnée d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique après défécation cuprobarytique.

	Complexe mercuriel				Mercure réduit	
	à 22°	Acétone en + de celle de l'urine normale	à 100°	Acide β en + de celle de l'urine normale	à 22°	à 100°
25 cm ³ urine normale	0,48 (1)	— (2)	0,53 (1)	— (3)	0,34 (1)	3,82 (1)
25 cm ³ d'urine + 1 mgr. 21 d'acétone	0,67	1,15	0,58	0,54	0,34	3,84
25 cm ³ d'urine + 2 mgr. 08 d'acide β -hydroxybutyrique	0,50	0,12	0,70	1,84	0,35	3,84
25 cm ³ d'urine + 1 mgr. 21 d'acétone + 2 mgr. 08 d'acide β -hydroxybutyrique	0,66	1,09	0,57	0,40	0,32	4,30

(1) Les résultats sont exprimés en cm³ d'iode N/10 utilisés pour dissoudre le complexe ou le mercure réduit.

(2) Résultats exprimés en milligrammes d'acétone et ramenés à la prise d'essai (1, 21).

(3) Résultats exprimés en milligrammes d'acide β -hydroxybutyrique et ramenés à la prise d'essai (2,08).

Cette méthode de défécation semble nous donner des résultats plus satisfaisants. Malheureusement elle est impuissante à pouvoir nous permettre d'éliminer en totalité les substances mercuro-réductrices de l'urine normale et, à chaud par exemple, il y a deux mercuro-réductions superposées : celle propre à l'urine et celle provoquée par l'acide β -hydroxybutyrique.

Constance et nature de ces substances mercuro-réductrices.

— Quelles sont donc ces substances, renfermées dans toute urine normale, qui précipitent tant à froid qu'à chaud par le réactif de NESSLER et qui se dissolvent en grande partie dans l'acide sulfurique et l'iodure de potassium ? Nous avons indiqué précédemment que la présence d'acide pyruvique et d'acide lactique ne pouvait suffire à expliquer la consommation en iode de l'urine.

Nous avons recherché :

a) d'une part si ces substances se trouvent dans toutes les urines et à une même concentration à différentes heures de la journée pour un même individu ;

b) D'autre part nous nous sommes efforcés d'apporter quelques lumières sur la nature de ces substances, en particulier de rechercher si elles sont volatiles.

1^o Constance de la mercuro-réduction d'une urine normale par le réactif de Nessler. — Nous avons procédé à des essais sur l'urine normale d'un même individu, urine recueillie à différentes heures de la journée. Nous avons fait sur chacune d'elles la défécation cuprobarytique et opéré comme de coutume en exprimant nos résultats en centimètres cubes d'iode N/10 (Tableau XXXII).

Les chiffres trouvés sont très variables avec les heures d'émission de l'urine. Il est donc vraisemblable que cette consommation d'iode varie également avec les individus et le régime alimentaire.

2^o Recherches sur la nature des substances donnant à froid un complexe mercuriel. — Il était intéressant de savoir si une partie de cette consommation d'iode n'était pas due à des traces d'acétone qui existaient à l'état normal dans toute urine [HUBBARD et NOBACK (34)], acétone non décelable par les réactifs habituels mais précipitable par le réactif de NESSLER qui est très sensible [P. FLEURY et AWAD (21)].

TABLEAU XXXII

Action mercurio-réductrice du réactif de Nessler sur des urines normales recueillies, chez un même individu, à différentes heures de la journée.

Cm ³ d'iode N/10 consommés à la température ordinaire et à 100° par les complexes mercuriels et par le mercure réduit	Complexe mercuriel		Mercure réduit	
	à la tempé- rature du laboratoire	à 100°	à la tempé- rature du laboratoire	à 100°
Première urine (7 h.)	0,84	1,18	0,68	8,44
Seconde urine (14 h.)	0,53	0,64	0,44	3,16
Troisième urine (17 h.) . . .	0,97	0,94	1,11	6,08
Quatrième urine (20 h.) . . .	0,94	1,28	0,84	7,56

Pour ce faire, le complexe, obtenu à la température ordinaire après une demi-heure de contact par action du réactif de NESSLER sur une assez grande quantité d'urine normale, a été repris par quelques centimètres cubes d'acide sulfurique à 20 p. 100 volume et le soluté sulfurique a été alors soumis à la distillation. Les réactions de LEGAL et de FROMMER, pratiqués sur ce distillat, ont toutes deux été négatives.

Extraction à l'éther de l'acide β -hydroxybutyrique en solutions pures. — L'urine normale ayant une mercurio-réduction qui lui est propre et qui a gêné de ce fait nos dosages par le réactif de NESSLER, nous avons songé à extraire de l'urine par l'éther, l'acide β -hydroxybutyrique qu'elle pouvait renfermer avant d'attaquer celui-ci par le réactif de NESSLER.

Nous avons fait quelques essais sur des solutions pures d'acide β -hydroxybutyrique en observant le *modus operandi* suivant :

Nous avons mis successivement dans un mortier :

5 cm³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique M/50,

1 cm³ d'acide sulfurique N,

4 cm³ d'eau,

et nous avons trituré le tout avec 25 grs de sulfate de soude anhydre. La poudre ainsi obtenue a été introduite dans un flacon à large ouverture bouché solidement au liège, et agitée trente minutes à l'agitateur mécanique avec 50 cm³ d'éther ; nous avons versé le contenu du flacon sur un filtre, et ce dernier avec la poudre qu'il retient a été lavé avec un peu d'éther pour compléter à un volume de 50 cm³ (1).

Nous avons alors tenté d'extraire, par une solution aqueuse alcaline, l'acide β -hydroxybutyrique en solution dans l'éther. Pour ce faire, nous avons introduit 50 cm³ de l'extractum étheré dans une ampoule à décantation avec 10 cm³ d'eau contenant 1 cm³ de soude normale. Nous avons retourné l'ampoule un assez grand nombre de fois, mais sans agiter afin d'éviter l'émulsion, puis soutiré la partie aqueuse après quelques minutes de repos. Après une nouvelle addition d'eau sodée à l'éther, nous avons joint le liquide soutiré au précédent et complété à un volume de 25 cm³.

Nous avons fait agir à chaud, comme à l'habitude, notre réactif de NESSLER sur 10 cm³ de cette solution sodique en opérant par comparaison avec un témoin constitué par de l'eau distillée à laquelle nous avons fait subir les traitements précédents, et un autre constitué seulement par du réactif de NESSLER et de l'eau distillée. Tous nos essais ont été faits en double. Nous avons ainsi trouvé 5 mgrs 94 et 5 mgrs 29 d'acide β -hydroxybutyrique, chiffres sensiblement moitié du chiffre théorique (10 mgrs 40).

Pensant qu'il y avait peut-être trop d'acide β -hydroxybutyrique par rapport à la quantité de réactif de NESSLER, nous n'avons plus expérimenté que sur 5 cm³ de l'extractum étheré au lieu de 10 cm³.

Il nous a paru intéressant d'autre part de nous rendre compte de la façon dont s'effectuait l'extraction, de voir si la plus grosse partie de l'acide pouvait être extraite par la première solution alcaline et si des épuisements ultérieurs permettaient d'en récupérer (Tableau XXXIII).

(1) Il est indispensable, pour toutes ces manipulations, d'utiliser un éther très pur, exempt de substances susceptibles de provoquer la réduction du réactif de NESSLER. Nous avons eu quelques déboires à ce sujet et il nous a fallu purifier l'éther rectifié du commerce que nous avions à notre disposition selon la technique de LEBEAU et COURTOIS (39) : Agiter l'éther rectifié du commerce avec deux volumes d'eau, décanter l'éther sur un mélange de chaux éteinte et de chlorure de calcium anhydre et distiller à la colonne de Vigreux après 48 heures de contact. Recueillir les neuf premiers dixièmes du distillat.

TABLEAU XXXIII

Action du réactif de Nessler, pour une même extraction, sur différents extractums alcalins susceptibles de renfermer de l'acide β -hydroxybutyrique.

	1 ^{er} extrac- tum étheré	2 ^e extrac- tum étheré	3 ^e extrac- tum étheré	Total des trois extrac- tums	Erreur p. 100
Milligrammes d'acide β -hydroxybutyrique trouvés par extraction étherée et action du réactif de NESSLER (1).	5,164	0,345	0	5,509	— 47,10

(1) Quantité d'acide β -hydroxybutyrique mise en jeu : 10 mgrs 40.

Deux extractions à l'eau sodée suffisent donc pour enlever à l'éther tout l'acide qu'il renferme ; malheureusement le rendement n'a guère dépassé la moitié du chiffre théorique, mais pour une prise d'essai de 2 cm³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique M/50 nous sommes parvenus à un rendement voisin de 75 p. 100 (2 mgrs 96 au lieu de 4 mgrs 16).

Ces rendements sont demeurés trop imparfaits pour que nous puissions songer à utiliser ce procédé d'extraction à l'éther. Il a dû certainement rester de l'acide β -hydroxybutyrique sur le filtre et dans la masse pulvérulente et pour avoir de meilleurs résultats il nous faudrait peut-être utiliser un appareil à extraction continue ce qui rendrait la technique beaucoup moins pratique. Pour cette raison nous n'avons pas poursuivi ces essais.

Action du réactif de Nessler à 100° sur des solutions pures d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique après défécation. —

Avant de poursuivre nos recherches sur l'urine nous avons voulu nous assurer que la défécation cupro-barytique ne modifiait pas les résultats obtenus avec des solutions pures d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique.

Nos résultats en opérant sur des solutions pures, préalablement déféquées, ont été nettement supérieurs à ceux obtenus avec l'urine

(Tableau XXXIV). Les chiffres obtenus sont sensiblement identiques à ceux que nous avons eus sans défécation cupro-barytique préliminaire.

TABLEAU XXXIV

Action du réactif de Nessler à 100° sur des solutions pures d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique après défécation préalable cupro-barytique.

		Solution pure d'acide β -hydroxybutyrique déféquée	Solution pure d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique déféquée	Milligrammes d'acide β -hydroxybutyrique mis en œuvre
1 ^{er} essai	Milligrammes d'acide β -hydroxybutyrique trouvés dans le complexe mercuriel	8,67	8,99	10,40
2 ^e essai	Milligrammes d'acide β -hydroxybutyrique trouvés dans le complexe mercuriel	8,44	9,21	10,40
	Milligrammes d'acide β -hydroxybutyrique trouvés dans les liquides de décan- tation	1,84	1,52	
	Total	10,28	10,72	10,40

Nous avons également trouvé sensiblement les mêmes chiffres en opérant notre dosage d'acide β -hydroxybutyrique par le réactif de NESSLER sur une solution déféquée et sur une solution qui ne l'était pas (Tableau XXXV).

TABLEAU XXXV

Action du réactif de Nessler à 100° sur une solution déféquée ou sur une solution pure non déféquée d'acide β -hydroxybutyrique.

Mise en œuvre de 2 mgrs. 08 d'acide β -hydroxybutyrique en solution pure	Complexe mercuriel	Mercure réduit
Après défécation	1,68	0,38 (1)
Sans défécation	1,75	0,20

(1) Le mercure réduit a été plus important pour la solution déféquée (du simple au double).

REPRISE DE NOS ESSAIS SUR L'URINE APRÈS DÉFÉCATION CUPRO-BARYTIQUE

Essais divers sur des urines normales additionnées de quantités connues d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique, et sur des urines de malades susceptibles d'en contenir. — Pour certaines on nous a fourni des mélanges préparés avec nos solutions titrées et nous ignorions le titre de ces mélanges.

Technique : Nous avons comparé les résultats obtenus par la méthode classique de VAN SLYKE et par notre technique au réactif de NESSLER. Voici comment nous pratiquons cette dernière :

Diluer l'urine au demi. Mesurer 12 cm³ de cette dilution dans un ballon jaugé de 50 cm³ et 6 cm³ dans un autre. Compléter pour chacun d'eux à 30 cm³ avec de l'eau distillée, ajouter 5 cm³ de solution de sulfate de cuivre à 10 p. 100 puis de l'eau de baryte à saturation à la température du laboratoire (1), en agitant bien, en quantité suffisante pour avoir un volume total de 50 cm³. Laisser en contact durant un quart d'heure et filtrer. Neutraliser 40 cm³ de chacun des filtrats par de l'acide sulfurique N à la touche au tournesol, compléter à 50 cm³ avec de l'eau distillée et filtrer à nouveau.

10 cm³ de chacun de ces deux filtrats sont alors additionnés de 15 cm³ de solution mercurielle et de 20 cm³ de lessive de soude à 10 p. 100 en poids. Après 5 minutes de contact, séparer par centrifugation le précipité obtenu et le laver avec environ 35 à 40 cm³ de réactif de NESSLER.

Réunir dans un Erlenmeyer les solutions alcalines décantées correspondant à la première prise d'urine et dans un autre ceux correspondant à la seconde prise, et porter les deux fioles au bain-marie bouillant pensant 4 heures, en même temps qu'un témoin constitué par 10 cm³ d'eau et autant de réactif de NESSLER qu'en comporte chacun des deux autres. Pour plus de sécurité, afin d'avoir une marge assez grande de réactif en excédent, il sera bon d'ajouter dans chacune des 3 fioles dont deux d'entre elles contiennent les liquides de décantation, avant de les porter à 100°, 15 nouveaux centimètres cubes de réactif de NESSLER (2).

(1) Le titre de cette eau de baryte est d'environ 0,3 N.

(2) Lors de l'action du réactif de NESSLER sur l'acide β -hydroxybutyrique d'une urine déféquée, nous avons ajouté primitivement au mélange

Chacun des complexes est alors isolé par centrifugation, lavé avec 15 à 20 cm³ de solution de chlorure de sodium à 5 p. 100 et repris par 5 cm³ d'acide sulfurique à 20 p. 100 volume (1) et 2 cm³ de solution d'iode de potassium à 20 p. 100 (2). Après filtration pour séparer le mercure réduit, le tube à centrifuger et le filtre sont lavés avec, trois ou quatre fois, 2 cm³ d'eau distillée, et le filtrat est additionné de 5 cm³ d'iode N/10 puis de 8 cm³ de lessive de soude pure. Après dix minutes de contact, acidifier par de l'acide chlorhydrique au demi-
de façon à dissoudre entièrement le précipité qui s'est formé par alcalinisation et titrer l'iode libéré par de l'hyposulfite de sodium N/50. La différence entre l'iode consommé par chacune des deux solutions urinaires et celui consommé par le témoin, nous donne la véritable consommation en iode de chacune d'elles :

Calcul : Soit n cm³ d'hyposulfite de sodium N/50 versés dans le témoin et n' cm³ dans le dosage, posons $n - n' \chi = N$.

Il y a eu $\left(5 - \frac{N}{5}\right)$ cm³ d'iode N/10 consommés et

$\left(5 - \frac{N}{5}\right) \times 0 \text{ gr. } 0017333 \times 6,25$ d'acide β -hydroxybutyrique oxydé en acétone dans la prise d'essai. Ce coefficient de 6,25 correspond à la dilution de l'urine dans la défécation cupro-barytique.

L'urine ayant été préalablement diluée au demi, si v est le volume de la prise d'essai d'urine (6 ou 12 cm³ dans nos essais), la teneur en acide β -hydroxybutyrique en grammes par litre est de

$$\left(5 - \frac{N}{5}\right) \times 0,0017333 \times 6,25 \times \frac{1000}{v/2}$$

soit $\left(5 - \frac{N}{5}\right) \times \frac{21,6}{v}$

5 cm³ d'une suspension de sulfate de baryum à 10 p. 100 pour faciliter la dispersion du complexe et partant la reprise de ce dernier par l'acide sulfurique dilué, mais nous n'avons pas continué car les résultats n'étaient pas meilleurs et les filtrations étaient beaucoup plus longues.

(1) Il est préférable de reprendre les précipités obtenus, tant à froid qu'à 100°, par 5 cm³ d'acide sulfurique à 20 p. 100 volume au lieu d'acide chlorhydrique 5 N : la dissolution est plus complète.

(2) Il nous est apparu que l'adduction d'iode de potassium après celle de l'acide sulfurique est indispensable pour dissoudre le complexe car lorsque nous n'en avons pas mis les résultats en acide β -hydroxybutyrique ont été beaucoup plus faibles (Tableau XXXVI).

TABLEAU XXXVI

Action du réactif de Nessler sur l'acide β -hydroxybutyrique d'une urine avec emploi ou non d'iodure de potassium.

Quantité d'urine mise en œuvre	Avec ou sans iodure de potassium	1 ^{er} essai	2 ^e essai	3 ^e essai	Quantité d'acide β -hydroxybutyrique mise en œuvre
20 cm ³	sans	0,866	2,166	1,083	10,40
20 cm ³	avec	5,85	6,39	6,50	10,40
10 cm ³	avec	8,50	8,50	8,125	10,40

Expérimentation : Dans nos essais, nous avons commencé par déterminer tant par la méthode de VAN SLYKE que par celle au réactif de NESSLER la teneur de l'urine normale en substances se comportant soit comme acétone, soit comme acide β -hydroxybutyrique. Cette réduction de l'urine a été exprimée à la température ordinaire en acétone et à 100° en acide β -hydroxybutyrique, ce qui nous a permis par déduction de connaître la réduction provoquée par l'acétone et par l'acide β -hydroxybutyrique surajoutés. Dans ce premier essai, si, par la méthode de VAN SLYKE, les chiffres trouvés en tenant compte ou non de cette réduction urinaire ont toujours été élevés, surtout pour l'acide β -hydroxybutyrique, par la méthode au réactif de NESSLER ils se sont révélés inférieurs et les résultats sont meilleurs si l'on ne tient pas compte de la dite réduction urinaire (Tableau XXXVII).

C'est d'ailleurs une règle générale que dans la méthode de VAN SLYKE les chiffres pèchent par excès ⁽¹⁾ et que c'est l'inverse qui se produit dans celle par le réactif de NESSLER. Nos efforts ont tendu à diminuer ce déficit pour rendre cette dernière méthode de dosage supérieure à l'autre.

⁽¹⁾ Avec sa technique, VAN SLYKE trouve dans une urine normale 0. mgr. 28 d'acétone et 0 gr. 50 d'acide β -hydroxybutyrique par litre.

BEHRE et BENEDICT ⁽⁴⁾ employant la même technique, trouvent sur deux échantillons d'urine normale : 1 gr. 7, 1 gr. 97, 0 gr. 74, 3 gr. 20 d'acide β -hydroxybutyrique par litre.

TABLEAU XXXVII

Dosage par la méthode de Van Slyke et par celle au réactif de Nessler, de l'acétone et de l'acide β -hydroxybutyrique ajoutés à une urine normale.

	Urine normale		Urine + acétone + acide β -hydroxybutyrique		Milligrammes d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique retrouvés compte tenu de la réduction urinaire		Milligrammes d'acétone et d'acide β -hydro. ajoutés
	Distillation et V. Slyke	Nessler	Distillation et V. Slyke	Nessler	Distillation et V. Slyke	Nessler	
Milligrammes d'acétone trouvés par litre	0,14	0,10	1,24	1,16	1,10	1,06	1,14
Milligrammes d'acide β -hydroxybutyrique trouvés par litre	0,25	0,15	2,60	1,85	2,36	1,70	2,08

Nous avons donc fait sur diverses urines, additionnées d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique en quantité variable, puis sur des urines de malades suspectées de contenir ces substances, des dosages de ces corps en utilisant les deux méthodes et en indiquant pour chacune des deux l'erreur par excès ou par défaut. Nous avons toujours tenu compte, pour les deux, de l'action réductrice propre de l'urine normale que nous avons soustraite (Tableau XXXVIII), sauf évidemment pour les urines des malades.

Nous ne parlerons pas de l'acétone, dont les résultats s'avèrent bien supérieurs par distillation, mais uniquement de l'acide β -hydroxybutyrique, seul corps qui nous intéresse. De l'examen de notre tableau il ressort que, dans l'ensemble, les quantités d'acide β -hydroxybutyrique trouvées par la méthode de VAN SLYKE se révèlent, par rapport à ce que nous aurions dû trouver, constamment plus élevées que celles

TABLEAU XXXVIII

Dosage par la technique de Van Slyke et par celle au réactif de Nessler, de l'acétone et de l'acide β -hydroxybutyrique ajoutés à une urine normale, compte tenu de l'action propre de l'urine.

Dilution préalable de l'urine (Pourcentage de cette dernière dans la solution primitive)	Cm ³ de prise d'essai d'urine diluée utilisés pour la détection	Teneur en grammes par litre				Pourcentage d'erreur par défaut ou excès			
		Acétone		Acide β -hydroxybutyrique		Acétone		Acide β -hydroxybutyrique	
		Ajoutée	Trouvée après précipitation par le Nessler à froid	Trouvée par distillation	Ajouté	Trouvée après précipitation par le Nessler à 100°	Trouvée par le Van Slyke	Trouvée après précipitation par le Nessler à froid	Trouvée par le Van Slyke
70	12 8 (³)	0,196	0,159 0,170	0,204	0,238	0,309 0,276	0,392	— 18,90 — 13,25	— 29,85 — 15,95
70	12 8	0,084	0,036 0,05	0,066	0,357	0,347 0,278	0,452	— 57,45 — 40,45	— 2,80 — 22,10
70	12 6	0,186	0,129 0,116	0,188	0,475	0,398 0,491	0,593	— 36,45 — 37,65	— 46,25 — 3,35
70	12 6	0,080	0,080 0,073	0,161	0,713	1,470 0,620	1,045	0 — 8,75	— 106 — 13,05
50	12 6	0,200	0,138 0,242	0,193	0,820	0,630 0,614	1,783	— 31 + 21	— 23,15 — 25,10
70	12 6	0,281	0,201 0,232	0,232	1,486	1,276 1,239	2,062	— 28,45 — 17,45	— 14,15 — 16,60

70.	12 6	0	0,021 0	0,006	1,486	0,992 1,135	1,986	+ 21 0	+ 6	- 33,25 - 23,60	+ 30,30
70	12 6	1,14	4,184 1,021	1,033	2,08	2,016 1,529	2,713	+ 3,60 - 10,65	- 9,60	- 3,05 - 26,50	+ 30,45
70	6 3	0,140	0,073 0,345	0,144	2,972	2,503 4,024	3,857	- 47,85 + 146	+ 2,85	- 15,70 + 35,40	+ 29,75
50	12 6	0,200	0,322 0,382	0,211	4,160	3,430 3,754	4,918	+ 61 - 91	+ 5,50	- 17,55 - 9,70	+ 18,20

Premier (4) ma- lade	1re urine (5)	0,248	0,260	0,369	0,540
	2e urine (5)	0,260	0,391	0,165	0,430
Second malade	1re urine (6)			0,282	0,024
	2e urine			0,325	0,095

(1) Acide β -hydroxybutyrique oxydé en acétone par le réactif mercuriel.

(2) Essais classés par quantités croissantes d'acide β -hydroxybutyrique.

(3) Tous ces essais ont été faits sur des urines différentes.

(4) Pour chaque malade, les deux urines ont été prélevées à 24 h. d'intervalle.

(5) Ces deux urines ont donné des résultats négatifs avec les réactions de LEGAL et de GÉRARDT; elles ne ren-

fermaient certainement ni acétone ni acide acétylacétique.

(6) Ces deux urines étaient lévogyres, albumineuses et ne renfermaient ni acétone, ni glucose. Elles ne conte-

naient vraisemblablement pas d'acide β -hydroxybutyrique.

obtenues en employant notre méthode. Toutefois les erreurs par défaut avec l'iodomercurate sont inférieures en valeur absolue aux erreurs par excès en employant la technique de VAN SLYKE.

Cependant, dans la pratique courante, nous nous trouverons en présence d'urines dont nous ne connaissons pas la teneur en substances réductrices autres que l'acide β -hydroxybutyrique et en dosant ce dernier nous doserons en même temps les dites substances. Il semble, en opérant ainsi, qu'il faille encore préférer notre méthode à celle de VAN SLYKE comme le montrent les résultats du tableau XXXIX où nous ne retranchons pas la quantité de substance se comportant comme l'acétone ou l'acide β -hydroxybutyrique dans l'urine normale avant addition de ces deux corps.

TABEAU XXXIX

Pourcentage d'erreur par excès ou par défaut en employant parallèlement la méthode de Van Slyke et celle au réactif de Nessler pour doser l'acide β -hydroxybutyrique dans des urines additionnées d'acide β -hydroxybutyrique, la teneur en substances se comportant comme l'acide β -hydroxybutyrique dans l'urine n'étant pas soustraite.

Méthodes employées	1 ^{er} essai	2 ^e essai	3 ^e essai	4 ^e essai	5 ^e essai	6 ^e essai	7 ^e essai	8 ^e essai	9 ^e essai
Technique de Van Slyke	+49,30	+47,60	+61,70	+ 144	+44,20	+19,75	+32,50	+23,45	+36,60
Technique au réactif de Nessler	+46,35	+57,25 +46,55	+15,70	+23,15 +32,20	+ 5 + 2,80	+1 ,10 - 1,15	- 8,80 +38,85	- 8,40 + 1,55	+23,55 + 0,65

Conclusions de ce chapitre. — Nous avons tenté d'appliquer à l'urine notre technique à l'iodomercurate. En solutions pures elle permet de doser l'acide β -hydroxybutyrique par action de l'iodomercurate à 100° en présence d'acétone et d'acide acétylacétique qui, précipitant à froid, peuvent être éliminés.

Les urines normales, soumises à une défécation cupro-barytique,

renferment des substances se comportant comme l'acétone et l'acide β -hydroxybutyrique. Nous avons ajouté à ces urines des quantités variables d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique. Nous avons comparé les résultats obtenus par notre technique à l'iodomercurate et par celle de VAN SLYKE. Pour le dosage de l'acide β -hydroxybutyrique, les résultats sont du même ordre : ils sont même en général un peu plus précis par notre technique.

D'une façon générale la méthode à l'iodomercurate fournit des résultats entachés d'une légère erreur par défaut et celle de VAN SLYKE des résultats un peu trop élevés.

CONCLUSIONS

Les méthodes habituellement utilisées en biochimie pour doser l'acide β -hydroxybutyrique ne donnent pas entière satisfaction.

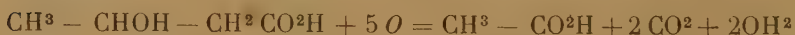
Dans les techniques par extraction étherée et dosage polarimétrique on observe des erreurs par défaut dues à une extraction incomplète et à une racémisation de l'acide.

Les techniques basées sur l'oxydation chromique de l'acide β -hydroxybutyrique en acétone sont entachées d'une importante cause d'erreur : dans les meilleures conditions 75 à 85 p. 100 seulement de l'acide sont transformés en acétone. D'autre part, dans l'urine, d'autres substances peuvent être oxydées en corps se comportant comme de l'acétone ; c'est ainsi que nous avons constaté que de même que l'acide β -hydroxybutyrique les acides pyruvique et citrique normalement présents dans l'urine fournissent après oxydation chromique des corps précipitant avec le sulfate mercurique dans la technique classique de VAN SLYKE.

Nous avons ainsi été amenés à étudier l'action de trois oxydants sur l'acide β -hydroxybutyrique :

1° **Une solution nitrique de bichromate de potassium.** — A. Une telle solution oxyde rapidement l'acide β -hydroxybutyrique. La réaction presque totale en 10 minutes à 100° est complète en 1 heure. A la température du laboratoire la réaction débute d'une façon très rapide, après quelques minutes elle se poursuit plus lentement et devient complète en 48 heures.

B. Une molécule d'acide β -hydroxybutyrique fixe presque 5 atomes d'oxygène et l'on peut établir ainsi l'équation globale de l'oxydation :



Divers faits permettent de considérer que les étapes intermédiaires de l'oxydation sont les suivantes :

a) Oxydation de l'acide β -hydroxybutyrique en acide acétylacétique :

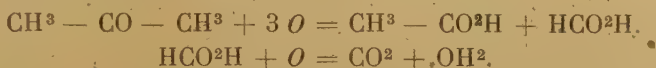


En effet, l'oxydation nitrochromique de l'acétylacétate d'éthyle exige un atome d'oxygène de moins que celle du β -hydroxybutyrate d'éthyle.

b) Décarboxylation de l'acide acétylacétique génératrice d'acétone. C'est une donnée classique que cette décarboxylation s'effectue aisément :



c) Oxydation de l'acétone naissante en acide acétique et acide formique, lui-même oxydé en anhydride carbonique et eau :



CORDEBARD a montré que l'acide formique est aisément oxydable, mais par contre l'acétone ne l'est que difficilement ; nous avons d'ailleurs confirmé ce fait.

Nous avons cependant caractérisé d'une façon indiscutable l'acétone comme stade intermédiaire de l'oxydation en utilisant une quantité de solution nitrochromique inférieure à celle nécessaire pour oxyder totalement l'acide β -hydroxybutyrique. Cette acétone est partiellement oxydable par addition d'une nouvelle quantité de solution nitrochromique.

Nous avons donc considéré comme plausible le fait qu'au cours de l'oxydation nitrochromique l'acétone apparaît sous une forme naissante aisément oxydable par la solution nitrochromique.

C. L'oxydation nitrochromique de l'acide β -hydroxybutyrique est assez spécifique. Dans les mêmes conditions l'acide butyrique n'est pas attaqué ; les acides α -hydroxybutyrique et β -oxypropionique, la diéthylcétone et la méthyléthylcétone ne sont que peu ou faiblement oxydés. Les acides lactique et acétylacétique sont par contre oxydés régulièrement.

D. Nous proposons de doser par les solutions nitrochromique l'acide β -hydroxybutyrique en solution pure, l'erreur moyenne est

d'environ 3 à 4 p. 100. La solution nitrochromique a une action trop peu sélective pour envisager des applications biologiques pratiques.

2° **L'acide periodique.** — L'acide periodique n'oxyde pratiquement pas l'acide β -hydroxybutyrique à la température ordinaire. A 100° et en milieu fortement acide il l'attaque d'une façon lente, irrégulière et incomplète qui paraît rendre impraticable toute application analytique.

3° **L'iodomercurate de potassium alcalin (réactif de Nessler).** — Celui-ci oxyde lentement à la température ordinaire l'acide β -hydroxybutyrique en donnant de l'acétone précipitée par le réactif. A 100°, la réaction est beaucoup plus rapide ; nous en avons étudié les modalités.

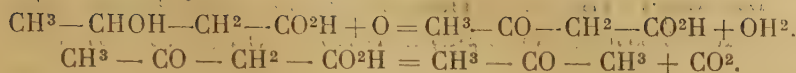
A. L'action oxydante et précipitante du réactif de NESSLER conduit à la formation d'acétone précipitée à l'état de complexe. Ce complexe associé à du mercure réduit est repris par un acide qui le solubilise ; le mercure réduit séparé par filtration est dosé par iodométrie. L'acétone redissoute est titrable par iodométrie et a été identifiée avec certitude.

B. A la température du bain-marie bouillant la formation de l'acétone n'est pas influencée par l'alcalinité du milieu, elle s'effectue assez lentement et il faut chauffer de 4 à 5 heures. Les rendements sont d'autant plus élevés que le réactif de NESSLER se trouve en plus grand excès par rapport à l'acide β -hydroxybutyrique.

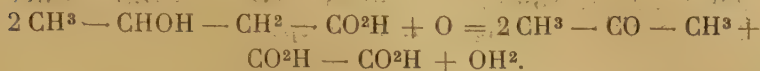
C. Nous avons obtenu en général des erreurs par défaut que nous avons pu attribuer à diverses causes : une petite quantité d'acétone n'est pas précipitée et est perdue lors de la séparation du complexe par centrifugation ; le lavage du précipité de complexe fait également disparaître un peu d'acétone ; enfin, une petite quantité d'acétone est volatilisée au cours du chauffage prolongé.

D. La quantité de mercure réduit formé au cours de la réaction varie assez sensiblement selon les conditions opératoires. Elle semble indiquer que le réactif de NESSLER oxyde l'acide β -hydroxybutyrique de deux façons différentes :

a) Oxydation en acide acétylacétique décarboxylé en acétone :



b) Oxydation directe en acétone :



Nous avons pu mettre au point une technique permettant de doser l'acide β -hydroxybutyrique avec une erreur par défaut moyenne de 5 p. 100 environ.

Cette technique par le réactif de NESSLER est un peu moins précise que celle basée sur l'action d'une solution nitrochromique, mais elle est beaucoup plus spécifique ; au lieu de doser la quantité d'oxydant disparu nous dosons l'acétone formée.

Nous avons ainsi été amenés à tenter d'appliquer à l'urine la technique à l'iodomercurate. En effet, sur des solutions pures, la technique à l'iodomercurate s'est révélée comme la plus précise des techniques relativement spécifiques connues.

Ces essais préliminaires nous ont montré que dans des mélanges de solutions d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique le réactif de NESSLER précipite à froid l'acétone ; l'acide β -hydroxybutyrique restant en solution est alors transformé en acétone par chauffage. Nous avons obtenu des résultats analogues, bien qu'un peu moins satisfaisants, avec des mélanges des acides acétylacétique et β -hydroxybutyrique.

D'autre part, deux constituants normaux de l'urine, les acides pyruvique et citrique donnent à chaud une faible quantité de précipité se comportant comme celui de l'acétone. Oxydés par le mélange sulfochromique et chauffés avec le sulfate mercurique selon le protocole de VAN SLYKE ces deux acides fournissent des précipités qui, exprimés en acétone, conduisent à des résultats plus élevés que ceux fournis par la technique à l'iodomercurate.

Nous avons utilisé cette dernière sur des urines additionnées de quantités définies d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique. Le dosage impraticable directement sur l'urine devient possible après défécation de l'urine par le sulfate de cuivre et la baryte. Nous avons comparé les résultats obtenus par la technique que nous proposons à ceux fournis par la technique de VAN SLYKE qui est actuellement presque la seule utilisée dans les laboratoires de biologie clinique.

Les urines normales renferment des substances^o se comportant comme l'acétone et l'acide β -hydroxybutyrique dans l'une et l'autre des deux techniques. Les quantités se retrouvent en général avec des erreurs assez notables par excès dans la technique de VAN SLYKE et des erreurs analogues par défaut en dosant par l'iodomercurate. Dans l'ensemble, la technique que nous proposons fournit des résultats équivalents, en général un peu plus précis que la méthode de VAN SLYKE.

En résumé, nous avons donc pu mettre au point, par l'emploi d'une solution nitrochromique et du réactif de NESSLER, deux techniques de dosage de l'acide β -hydroxybutyrique en solutions pures plus précises que les techniques actuellement connues. La technique au réactif de NESSLER appliquée à l'urine fournit des résultats au moins équivalents à ceux de la technique classique de VAN SLYKE.

Vu : le Président de la thèse,

P. FLEURY.

Vu : le Doyen,

A. DAMIENS.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,

Gilbert GIDEL

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AMBERT (P.). — Entraînement des sucres et des polyols par le sulfate de cuivre et la baryte. — *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*. Paris, 1929.
- [2] AWAD (Y.). — Le dosage de l'acétone au moyen de ses combinaisons mercuriques et ses applications. — *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*. Paris, 1926.
- [3] BARNES (R. H.) et WICK (A. N.). — A method for the determination of blood acetone bodies. — *J. biol. Chem.*, 1939, **131**, 413.
- [4] BEHRE (J. A.) et BENEDICT (S. R.). — A colorimetric method for the determination of acetone bodies in blood and urine. — *J. biol. Chem.*, 1926, **70**, 487.
- [5] BIGET (P.). — Recherches sur la phosphatase urinaire. — *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*. Paris, 1943.
- [6] BLACK (O. F.). — The detection and quantitative determination of β -oxybutyric acid in the urine. — *J. biol. Chem.*, 1908-1909, **5**, 207.
- [7] BOISSON (M^{lle} R.). — Action de l'acide periodique sur l'acide lactique et l'acide pyruvique. — *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*. Paris, 1939.
- [8] BOUGAULT (J.), CATTELAINE (E.) et CHABRIER (P.). — Contribution à l'étude du nickel de Raney. — *Bull. Soc. chim.*, 1938 (5), **5**, 1699.
- [9] BOUGAULT (J.) et GROS (R.). — Nouvelles applications analytiques du réactif de Nessler. Caractérisation des acétones; dosage des aldéhydes. — *J. Pharm. et Chim.*, 1922 (7), **26**, 5.
- [10] CHAUSSIN (C.). — Hydrogénation à l'aide du nickel de Raney. — *Dipl. ét. supér.* Angers, 1934, p. 6.
- [11] CORDEBARD (H.). — Le dosage titrimétrique des substances organiques par oxydation chromique. Emploi de liqueurs titrés stables : les solutions nitrochromiques. — *J. Pharm. et Chim.*, 1939 (8), **30**, 263.
- [12] COVERT (L. W.) et ADKINS (H.). — Nickel by the Raney process as a catalyst of hydrogenation. — *J. americ. chem. Soc.*, 1932, **54**, 4116.
- [13] GRANDALL JR (L. A.). — A method for acetone bodies in blood,

- applicable to the determination of small amounts of mercury. — *J. biol. Chem.*, 1940, 133, 539.
- [14] DELÉPINE (M.) et HOREAU (A.). — Sur l'hydrogénation de quelques composés carbonylés par le nickel et le nickel platiné. Influence d'un alcali. — *C. R. Ac. Sc.*, 1935, 201, 1301.
- [15] DELÉPINE (M.) et HOREAU (A.). — Sur l'hydrogénation de quelques composés carbonylés par le nickel et le nickel recouvert des métaux de la famille du platine. Influence d'un alcali. — *Bull. Soc. chim.*, 1937 (5), 4, 31.
- [16] DENIGÈS (G.). — Précis de Chimie analytique. — 6^e édit., t. I, p. 234, Paris, 1930.
- [17] EICHLER (O.) et HINDEMITH (H.). — Versuche zur Methode der Bestimmung des Acetonkörper, insbesondere der β -Oxybuttersäure. — *Biochem. Zeitschr.*, 1943, 31, 73.
- [18] ENGELFELDT (N. O.). — Ueber die Oxydation der Acetessigsäure. — *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1920-1921, 112, 176.
- [19] FLEURY (P.). — Fiches techniques de chimie biologique. — 3^e édit., Paris, 1939.
- [20] FLEURY (P.) et AMBERT (P.). — Etude de la précipitation du glucose par le sulfate de cuivre et la baryte. Généralisation aux sucres et aux polyols. — *J. Pharm. et Chim.*, 1930 (8), 12, 289.
- [21] FLEURY (P.) et AWAD (Y.). — Nouveau procédé de dosage de l'acétone et son application à l'urine. — *J. Pharm. et Chim.*, 1926 (8) 3, 406 et 449.
- [22] FLEURY (P.) et BOISSON (M^{lle} R.). — Action de l'acide périodique sur les acides lactique et pyruvique. — *C. R. Ac. Sc.*, 1937, 204, 1264.
- [23] FLEURY (P.) et CARBOU (J.). — Dosage de l'acétone urinaire à l'aide de l'appareil pour microschloesing. — *J. Pharm. et Chim.*, 1938 (8), 28, 102.
- [24] FLEURY (P.) et LANGE (J.). — Etude de l'action de l'acide périodique sur les composés polyhydroxylés. — 1^{re} partie : Techniques utilisées. — *J. Pharm. et Chim.*, 1933 (8), 17, 196.
- [25] FLEURY (P.) et MARQUE (J.). — Etude de l'action de l'iodomercurate de potassium en milieu alcalin sur les polyols et les corps voisins. Applications analytiques. — *J. Pharm. et Chim.*, 1929 (8), 10, 241.
- [26] FLOUQUET (M.). — Contribution à la recherche et au dosage des corps cétoniques : acétone et acide acétylacétique. — *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*. Lille, 1943.
- [27] FOLIN (O.) et DENIS (W.). — Turbidity methods for the determination of acetone, acetoacetic acid and β -oxybutyric acid in urine. — *J. biol. Chem.*, 1914, 18, 263.
- [28] FRICKE (R.). — Ueber die analytische Erfassung und Differenzierung von Acetaldehyd, Aldol und Glyoxylsäure, sowie deren

- Vorkommen im Diabetikerharn. — *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1921, **116**, 129.
- [29] FROMMER (W.). — Neue Reaktion zum Nachweise von Aceton. — *Berl. klin. Wochenschr.*, 1905, **42**, 1008.
- [30] GROS (R.). — Sur quelques applications du réactif de Nessler. — *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1923.
- [31] HARTLEY (W. H.). — The four carbon atom acids of diabetic urine. — *Quart. Journ. Med.*, 1916, **9**, 301.
- [32] HILLY (G.). — Hydrogénation de quelques dérivés furaniques à l'aide du nickel de Raney. — *Dipl. ét. supér.* Angers, 1936, p. 8.
- [33] HUBBARD (R. S.). — Note on the determination of β -hydroxybutyric acid. — *J. biol. Chem.*, 1924, **49**, 351.
- [34] HUBBARD (R. S.) et NOBACK (G. V.). — Note on the concentration of the acetone bodies in normal blood and urine. — *J. biol. Chem.*, 1925, **63**, 391.
- [35] JOWETT (M.) et QUASTEL (J. H.). — The oxidation of normal saturated fatty acids in the presence of liver slices. — *Biochem. J.*, 1935, **29**, 2159.
- [36] KÜLZ (E.). — Zur Prioritätsfrage bezüglich der Oxybuttersäure im diabetischen Harn. — *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1884, **18**, 290.
- [37] LANGE (J.). — Action de l'acide périodique sur les polyalcools. — *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1933.
- [38] LAURSEN (F.). — Ein Mikroverfahren zur quantitativen Bestimmung des Acetons und der β -oxybuttersäure für klinische Untersuchungen. — *Klin. Wochenschr.*, 1936, **15**, 339.
- [39] LEBEAU (P.) et COURTOIS (G.). — *Traité de Pharmacie chimique*. — 2^e édit., t. I, p. 726. Paris, 1938.
- [40] LÉGAL (M.). — Recherche de l'acétone dans l'urine. — *J. Pharm. et Chim.*, 1888 (5), **18**, 206.
- [41] LEITESS (S. M.) et ODINOW (A. I.). — Apparat zur Bestimmung von Ketonkörpern im Blut. — *Chem. Centralblatt.*, 1940, **1**, 608.
- [42] LEMOIGNE (M.) et ROUKHELMAN (M^{lle} N.). — Variations et caractérisation chez les microbes d'un produit de polymérisation de l'acide β -hydroxybutyrique. — *C. R. Ac. Sc.*, 1940, **211**, 673.
- [43] MAGNUS-LÉVY (A.). — Die Oxybuttersäure und ihre Beziehungen zum Coma diabeticum. — *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1899, **42**, 149.
- [44] MALAPRADE (L.). — Action des polyalcools sur l'acide périodique. Application analytique. — *Bull. Soc. chim.*, 1928 (4), **43**, 683.
- [45] MARIOTT (W. Mck.). — The determination of acetone. — *J. biol. Chem.*, 1913-1914, **16**, 281 ; **16**, 289 ; **16**, 293.
- [46] MARQUE (J.). — Contribution à l'étude de l'oxydimétrie du mercure. Action du chloriodomercurate de potassium alcalin sur les polyols et les corps voisins. Applications analytiques. — *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1929.

- [47] MINKOWSKI (O.). — Ueber das Vorkommen von Oxybuttersäure im Harn bei Diabetes mellitus. — *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1884, 18, 35.
- [48] MORE (J.). — Sur une réaction de l'allantoïne applicable à son dosage. — *J. Pharm. et Chim.*, 1923 (7), 27, 209.
- [49] POSTIC (F.), COURTOIS (J.) et RABATÉ (J.). — Dosage de l'alcool dans le sang par la technique nitrochromique de Cordebard. — *J. Pharm. et Chim.*, 1940 (9), 1, 526.
- [50] RANEY. — *U. S. Patent* 1628.190, 19 mai 1927.
- [51] ROTHERA (A. C. H.). — Note on the sodium nitro-prusside reaction for acetone. — *J. of Physiol.*, 1908, 37, 491.
- [52] SALKOWSKI (E.). — Ueber die Verbindungen des Traubenzuckers mit Kupferoxydhydrat. — *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1879, 3, 79.
- [53] SCHAEFFER (P. A.). — A method for the quantitative determination of β -oxybutyric acid in urine. — *J. biol. Chem.*, 1908-09, 5, 211.
- [54] STADELMANN (E.). — Ueber die Ursachen der pathologischen Ammoniak-ausscheidung beim Diabetes mellitus und des Coma diabeticum. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1883, 17, 419.
- [55] TERROINE (E. F.) et TRIMBACH (H.). — L'excrétion urinaire des corps cétoniques dans l'inanition chez les diverses espèces animales. — *C. R. Ac. Sc.*, 1931, 193, 1345.
- [56] VAN SLYKE (D. D.). — Studies of acidosis. VII : The determination of β -oxybutyric acid, acetoacetic acid, and acetone. — *J. biol. Chem.*, 1917, 32, 455.
- [57] VAVON (G.). — Hydrogénation catalytique des cétones en présence de noir de platine. Transformation en alcools des aldéhydés et des cétones. — *Annales de Chim.*, 1914 (9), 1, 144.
-

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION.....	7
PLAN DU TRAVAIL.....	13

PREMIÈRE PARTIE

ACTION DE DIFFÉRENTS RÉACTIFS OXYDANTS SUR DES SOLUTIONS PURES D'ACIDE β -HYDROXYBUTYRIQUE

CHAPITRE I. — Préparation des corps utilisés.....	18
A) Préparation du β -hydroxybutyrate d'éthyle.....	18
Principe.....	18
Préparation du nickel de RANEY.....	18
Appareil à hydrogénation ; description ; fonctionnement..	19
Hydrogénation de l'acétylacétate d'éthyle.....	21
Distillation.....	21
Obtention du β -hydroxybutyrate d'éthyle par hydrogé- nation catalytique de l'acétylacétate d'éthyle, en fonc- tion du temps et de l'alcalinité.....	22
* Graphique n° 1.....	22
Courbe n° 1.....	22
Densité ; indice de saponification.....	23
B) Préparation du β -hydroxybutyrate de baryum à partir du β -hydroxybutyrate d'éthyle.....	23
CHAPITRE II. — Action des solutions nitrochromiques sur l'acide β -hydroxybutyrique.....	26
Introduction.....	26
Réactifs utilisés.....	27
Principe de la technique. Technique.....	28
Oxydation de 1 cm ³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique M/10 par 10 cm ³ de solution nitrochromique en fonction du temps (Courbe n° II).....	30
Action du réactif nitrochromique sur l'acétone.....	33

Recherche de l'acétone au cours de l'oxydation nitrochromique.	33
Dosage de l'acide β -hydroxybutyrique en présence d'acétone..	35
Influence de la dilution	38
Action de la solution nitrochromique sur quelques autres corps voisins de l'acide β -hydroxybutyrique.....	39
Oxydation de 1 cm ³ de solution M/10 de différents corps voisins de l'acide β -hydroxybutyrique par 10 cm ³ de solution nitro- chromique en fonction du temps (Graphique n° II).....	41
Technique proposée pour le dosage de l'acide β -hydroxybuty- rique en solutions pures.....	42
Conclusions du chapitre II.....	44
 CHAPITRE III. — Action de l'acide periodique sur l'acide β-hydro- xybutyrique	
Introduction.....	45
Attaque de l'acide β -hydroxybutyrique en fonction du temps et de la température.....	45
Attaque de l'acide β -hydroxybutyrique en fonction de la con- centration en acide.....	46
Attaque de l'acide β -hydroxybutyrique en ampoules scellées au bain-marie bouillant.....	47
Recherche de l'aldéhyde ou de la cétone formée au cours de la réaction	48
Conclusions du chapitre III.....	50
 CHAPITRE IV. — Action de l'iodomercurate alcalin sur l'acide β-hydroxybutyrique	
Introduction.....	51
Protocole opératoire	51
Oxydation de 1 cm ³ de solution d'acide β -hydroxybutyrique M/5 par le réactif de NESSLER en fonction de la durée de chauffe à 100° (Courbe n° 3).....	53
Influence de l'alcalinité du milieu.....	55
Influence du temps de chauffe.....	56
Influence de la concentration en réactif oxydant.....	58
Examen critique du mécanisme réactionnel.....	59
Solubilité du complexe.....	61
Action du réactif de NESSLER sur l'acide β -hydroxybutyrique en vapeur fluente	64
Technique proposée pour le dosage de l'acide β -hydroxybuty- rique en solutions pures.....	65
Conclusions du chapitre IV.....	67

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES EN VUE D'APPLIQUER A L'URINE
LE DOSAGE DE L'ACIDE β -HYDROXYBUTYRIQUE
PAR LE RÉACTIF DE NESSLER

CHAPITRE I. — Dosage de l'acide β-hydroxybutyrique en solutions pures additionnées de substances pouvant se rencontrer dans l'urine.	71
Introduction	71
Dosage de mélanges d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique :	
a) Influence du temps de contact	72
b) Influence des proportions de réactifs	73
Action du réactif de NESSLER sur l'acide acétylacétique	73
Action du réactif de NESSLER sur quelques acides existants dans l'urine normale	75
 CHAPITRE II. — Action du réactif de Nessler sur des urines additionnées de quantités connues d'acétone et d'acide β-hydroxybutyrique	77
Considérations générales	77
Action directe du réactif de NESSLER sur une urine additionnée ou non d'acétone	77
Essais sur l'urine déféquée par le cuivre et la baryte	79
Constance et nature de ces substances mercuro-réductrices	81
a) Constance de la mercuro-réduction d'une urine normale par le réactif de NESSLER	81
b) Recherches sur la nature des substances donnant à froid un complexe mercuriel	81
Extraction à l'éther de l'acide β -hydroxybutyrique en solutions pures	82
Action du réactif de NESSLER à 100° sur des solutions pures d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique après défécation	84
<i>Reprise de nos essais sur l'urine après défécation cupro-barytique.</i>	86
Essais divers sur des urines normales additionnées de quantités connues d'acétone et d'acide β -hydroxybutyrique, et sur des urines de malades susceptibles d'en contenir	86
a) Technique	86

b) Calcul	87
c) Expérimentation.....	88
Conclusions de ce chapitre.....	92
CONCLUSIONS	94
BIBLIOGRAPHIE.....	99
TABLE DES MATIÈRES.....	103

1028. — Imp. Jouve et Cie, 15, rue Racine, Paris (N^o 31.0939). — 2-1944
